

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program

Lékařská imunologie

**Změny v expresi membránových molekul CD200R, CD95, CD95L
a solubilního CD200R regulujících zánětlivou odpověď u pacientů
podstupujících kardiochirurgický zákrok**

**Changes in expression of membrane molecules CD200R, CD95,
CD95L, and soluble CD200R regulating inflammatory responses
in patients undergoing cardiac surgery**

MUDr. Drahomíra Holmannová

Školitel: prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

Hradec Králové, 2017

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy.

Hradec Králové, 2017

Poděkování:

Mé poděkování patří všem, kteří se podíleli na realizaci výzkumného projektu i disertační práce, tj. personálu UKIA a Kardiochirurgické kliniky FNHK. Zvláštní poděkování pak patří mému školiteli prof. RNDr. Janu Krejskovi, CSc. za příležitost účastnit se tohoto výzkumu, trpělivost, podporu, cenné rady a předávání vědomostí, prof. MUDr. Jiřímu Mandřákovi Ph.D. za pomoc a upřesnění klinických náležitostí studie a Mgr. Martině Koláčkové, Ph.D. za ochotu a pomoc, již se mi od ní v hojné míře dostávalo.

Obsah

1. Souhrn.....	8
2. Úvod.....	11
2.1 Kardiochirurgické řešení srdečních chorob.....	11
2.2 Typy srdečních operací.....	12
2.2.1 Operace s použitím mimotělního oběhu	12
2.2.2 Operace bez použití MO (tzv. off-pump operace, tzv. operace na bijícím srdci)....	14
2.2.3 Miniinvasivní operace	15
2.3 Farmakologické ovlivnění organismu, vliv anestezie na rozvoj zánětlivé pooperační reakce.....	16
2.4 Neimunitní odpověď organismu na operační trauma modulující imunitní odpověď	18
2.4.1 Aktivace hypotalamo-hypofyzární osy a produkce hormonů	18
2.4.2 Zánětlivý reflex závislý na vagovém nervu	19
2.5 Ischemicko-reperfúzní (I/R) syndrom	21
2.5.1 Reperfúzně-ischemické poškození tkání na buněčné a molekulární úrovni	21
2.5.2 Reperfúze a reperfúzní poškození tkání.....	22
2.5.3 No reflow fenomén – neobnovení průtoku cévou.....	24
2.6 Aktivace komplementového, koagulačního a fibrinolytického systému – další reakce imunitního systému na něj navazující – endotel, kardiomyocyty	25
2.6.1 Propojenost komplementové – koagulační – fibrinolytické a kininové kaskády	27
2.6.2 Endotel a ischemicko-reperfúzní poškození (I/R)	29
2.6.3 Kardiomyocyty, zdroj cytokinů a dalších mediátorů	30
2.6.4 Vybrané humorální působky, enzymy a receptory podílející se na pooperační zánětlivé reakci	31
2.7 Homeostatické mechanismy zapojující se do regulace zánětu u kardiochirurgických zákroků	39
2.8 Paréza funkce imunitního systému po operaci, ovlivnění zánětu.....	41
2.9 Obecný popis změn aktivity a funkcí monocytů a neutrofilů při operačních zákrocích	43
2.9.1 Monocyty, uplatnění v reakci na operační zákrok	43
2.9.2 Neutrofily, uplatnění v reakci na operační zákrok.....	45
3. Molekuly CD200R a CD200, charakteristika a funkce	47
3.1 Historie, popis molekuly CD200 a CD200R	47

3.2 Charakteristika a struktura povrchových molekul CD200R a CD200	48
3.3 Exprese molekul CD200 a CD200R.....	49
3.4 Signalizační kaskáda spojená s aktivací CD200R.....	50
3.5 Receptor CD200R a jeho ligandy	54
3.6 Solubilní forma receptoru CD200R, sCD200R.....	55
3.7 Klinické aspekty spojené s interakcí CD200R a CD200.....	56
3.7.1 Kostí, metabolismus kostí, osteoklastogeneze vs. osteoblastogeneze	57
3.7.2 Nádory, pronádorová aktivita a role CD200R v patogenezi a progresi nádorového bujení.....	57
3.7.3 Viry a jejich homolog CD200, únik virů před imunitním systémem	59
3.7.4 Plíce, role CD200 a CD200R signalizace v patologiích plic	61
3.7.5 Centrální nervová soustava, nemoci s ní spojené a role molekul CD200 a CD200R v patogenezi	62
3.7.6 Transplantační medicína, navození tolerance pomocí molekul CD200 a CD200R	64
3.7.7 Kůže, homeostáza navozená pomocí CD200 a CD200R.....	66
3.7.8 CD200R v patologii autoimunitních nemocí	68
3.7.9 Cévní systém a role CD200 a CD200R	70
3.7.10 Zapojení signalizace CD200R do hypersenzitivních reakcí	71
4. CD95/Fas, charakteristika a funkce	72
4.1 Charakteristika CD95 ligandu, vazby, exprese	74
4.2 Formy CD95L – solubilní, membránově vázané.....	75
4.3 Signalizace zprostředkovaná vazbou mezi CD95 a CD95L.....	76
4.4 Sestavení komplexu DISC po vazbě CD95L a CD95	77
4.5 Dva druhy buněk dle charakteru sestavování DISC	79
5. Cíl:.....	82
6. Postup a metody:.....	82
6.1 Pacienti, demografická data, klinické aspekty.....	82
6.2 Popis operace	86
6.2.1 Vedení anestezie	87
6.3 Laboratorní metodiky:	87
6.3.1 Odběr a zpracování krevních vzorků	88
6.3.2 Přístrojové a programové vybavení	89
6.4 Statistické vyhodnocení	89

7. Výsledky	90
7.1 Exprese znaku CD200R, CD95 a CD95L na granulocytech.....	92
7.2 Exprese sledovaných molekul CD200R a CD95 na monocytech	97
7.3 Sérová koncentrace solubilního receptoru CD200R	101
8. Diskuse.....	102
9. Závěr a zhodnocení přínosu studie a možnosti dalších kroků	108
10. Literatura	110
10.1 Publikované články.....	156

Zkratky

ADAM28 – Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 28

ADCC – Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

AMP – Adenosine monophosphate

APC – Antigen presenting cells

ARDS – Acute respiratory distress syndrom

ATP – Adenosine triphosphate

β 2-AR – β 2-adrenergic receptor

CABG – Coronary artery bypass graft

CBRM1/5 – Integrin α M

cFLIP – FLICE-inhibitory protein

cGMP – Cyclic guanosine monophosphate

CK-MB – Creatine kinase muscle and brain

CLL – Chronic lymphocytic leukemia

CPC – Complement depending cytotoxicity

CRP – C-reactive protein

CTLA-4 – Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

DAF – Decay-accelerating factor

DAMP – Danger-associated molecular patterns

DAP-12 – DNAX activating protein of 12 kDa

DISC – Death inducing signalling complex

Dok1, 2 – Docking protein 1, 2

ERK – Extracellular signal-regulated kinases

ESE – Exonic splicing enhancer

GIG-1 G-CSF – Induced gene 1 protein

GLUT-1 a GLUT-4 – Glucose transporter 1, 4

HIF-1 α – Hypoxia induced factor 1 α

HMGB1 – High-mobility group box-1

HSF-1 – Heat shock factor protein 1

Hsp60 – Heat shock protein 60

ICAM-1 –Intercellular adhesion molecule 1

IDO – Indoleamine2,3-dioxygenase

iNOS – Inducible nitric oxide synthase

ITAM – Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM – Immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif

JNK – c-Jun N-terminal kinase

Lck – Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LFA-1 – Lymphocyte function-associated antigen 1

LPS – Lipopolysaccharide

LTA – Lipoteichoic acid

M-CSF – Macrophage colony-stimulating factor

Mac-1 – Macrophage-1 antigen

MAPK – Mitogen-activated protein kinases

MCP-1 – Monocyte chemoattractant protein-1

MHC I, II –Major histocompatibility complexes

MIP-1 α – Macrophage inflammatory protein-1 α

MO – Mimotělní oběh

MPO – Myeloperoxidase

MyD88 – myeloid differentiation factor 88

NK – Natural killer

OPG – Osteoprotegerin

PAF – Platelet-activating factor

PLC- γ – Phosphoinositide phospholipase C

PD-1 – Programmed cell death protein 1

PDGF – Platelet derived growth factor

PECAM – Platelet endothelial cell adhesion molecule

PF4 – Platelet factor 4

PGE-2 – Prostaglandin 2

PI3K – Phosphatidylinositol 3-kinase

PIP₂ – Phosphatidyl inositol biphosphate

PSGL-1 – P-Selectin glycoprotein ligand 1

PKA – Protein kinase A

PKC ϵ – Protein kinase C- ϵ

PLAD – Preligand-binding assembly domain

Plg-RKT – Plasminogen receptor C-Terminal Lysine Transmembrane Protein

PTB domény – Protein tyrosin binding domains

PTX3 – Pentraxin 3

RANK – Receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$

RANKL – Receptor activator of nuclear factor $\text{NF}\kappa\beta$ ligand

RANTES/CCL5 – Regulated on activation normal T cells expressed and secreted/CC chemokine subfamily member

ROS – Reactive oxygen species

SF2/ASF – Serine/arginine-rich splicing factor 1

SH2 – Src homology domains 2

SH3 – Src-homology 3 domains

SHP-1 – Src homology 2 domain-containing phosphatase 1

SIRS – Systemic inflammatory response

SPOTs – Signaling proteinoligomerization structures

TGF- β – Transforming growth factor β

TIMP-1, 2 – Metallopeptidase inhibitor 1

TLR 2 a TLR 4 – Toll like receptor 2, 4

TNF α – Tumor necrosis factor α

Treg – Regulatory T cell

TREM-1 – Triggering receptor-1

TRIF – TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

VCAM – Vascular cell adhesion molecule

VEGF – Vascular endothelial growth factor

VLA-4 – Very late antigen-4

Zap70 – Zeta-chain-associated protein kinase 7

1. Souhrn

Srdeční operace jsou spojené s rozvojem komplexní fyziologické reakce, která se klinicky manifestuje v podobě systémové zánětlivé odpovědi (SIRS). Faktory, které se podílejí na rozvoji této reakce, zahrnují poškození tkání, ischemii srdečního svalu, reperfuzi, použití anestezie, kardioplegii, použití mimotělního oběhu aj. Přehnaná aktivace imunitního systému může vyústit v život ohrožující multiorgánové selhání, a zvyšovat tak morbiditu i mortalitu v pooperačním období. Zvýšená aktivita imunitního systému je vyrovnávána působením protizánětlivých a regulačních mechanismů spadajících pod buněčnou i humorální složku imunitního systému. Jedním z nich je exprese protizánětlivých molekul, které jsme monitorovali: CD200/CD200R, sCD200R a CD95/CD95L.

Metody: Studie zahrnovala měření exprese CD95, CD95L, CD200R, a sCD200R na povrchích granulocytů a monocytů ve vzorcích 30 pacientů, kteří se podrobili srdeční operaci s použitím mimotělního oběhu. Krevní vzorky byly odebírány v preoperačním, bezprostředně po operaci a dále pak 1., 3. a 7. den po operaci a analyzovány pomocí průtokové cytometrie a v případě sCD200R metodou ELISA.

Výsledky: Ve výsledcích byl pooperačně zachycen výrazný relativní nárůst granulocytární populace exprimující protizánětlivou molekulu CD200R, a to z 5 % na 17,8 %. Dle toho, že tato populace je převážně CD200R⁺CD95⁻, tedy tyto buňky nevýrazně exprimují CD95, lze předpokládat i jejich nižší vnímavost k apoptóze. Pouze malé procento CD200R⁺ granulocytů expimovalo i molekulu CD95. Nárůst této populace byl z 0,5 % na 2,06 %. U této granulocytární subpopulace bylo také zaznamenáno snížení exprese CD200R, což ji může pasovat do role zdroje solubilního CD200R, jehož koncentrace v séru vzrostla z 96 na 294 ng/ml. Expese CD95L na CD200R⁺ granulocytech měla bifázický charakter. Po krátkodobém snížení exprese okamžitě po operaci se tato zvýšila a maxima dosáhla 3. pooperační den. Relativní zastoupení CD200R⁺ monocytů se zvýšilo 1. pooperační den z 30,6 na 49,4 %, 7. pooperační den pak hodnota klesla pod předoperační, a to z 30,6 na 19,8 %. Monocytární CD200R⁺ populace byla tvořená hlavně monocyty CD200R⁺CD95⁺, které společně s expresí CD200R zvýšily i expresi CD95. Rozdíl na hladině $p \leq 0,05$ byl považován za statisticky významný.

Závěr: naše data ukazují, že kardiochirurgický zákrok mění expresi CD200R, CD95 a CD95L, stejně tak i koncentraci sCD200R a zároveň poukazuje na jejich zapojení do buněčné regulace v podobě inhibice či apoptózy, jež jsou spojeny s kardiochirurgickým zákrokem.

Summary

Introduction: Cardiac surgery is associated with the development of a complex physiological response that is clinically manifested as a systemic inflammatory response syndrome (SIRS). The factors that trigger the inflammatory response include tissue injury, myocardial ischemia, reperfusion, use of anaesthesia, cardioplegia, extracorporeal circuit etc. Exaggerated immune system activation can lead to a progression of SIRS, to life-threatening multi-organ dysfunction (MOD) and increased morbidity/mortality in the postoperative period. Excessive activation of the immune system is counterbalanced by both cellular and humoral regulatory and inhibitory mechanisms, such as expression of molecules that we monitored: CD200/CD200R, sCD200R and CD95/CD95L.

Methods: The study included the measurement the expression of CD95, CD95L, CD200R, and sCD200R molecules in granulocyte and monocyte populations in blood samples of 30 patients who underwent heart surgery using CPB. Samples were collected before surgery, after surgery, and in the postoperative period (1st, 3rd, 7th day) and analyzed by flow cytometry and sCD200R by ELISA.

Results: We found a significant increase in the percentage of granulocytes featuring anti-inflammatory molecule CD200R (from 5 % to 17.8 %) after surgery. We presume that these cells were less susceptible to apoptosis, because they rarely expressed CD95 as the CD200R⁺CD95⁻ granulocyte subpopulation prevailed. Only a small percentage of CD200R⁺ granulocytes expressed simultaneously CD95 (from 0.5 to 2.06 %). This small population of CD200R⁺CD95⁺ cells decreased expression of CD200R after surgery, and thus was likely to be a source of increased sCD200R in serum (from 96 to 294 ng/mL). Expression of CD95L on CD200R⁺ granulocytes showed biphasic character; transient decrease immediately after surgery was followed by increased expression of CD95L with maximum on the 3rd day. The percentage of CD200R⁺ monocytes was elevated on the 1th postoperative day (from 30.6 to 49.4 %) and dropped below the preoperative value on the 7th day after surgery (from 30.6 to

19.8 %). This population comprised mainly CD200R⁺CD95⁺ monocytes in which the enhanced expression of CD95 was found (from 36,1 to 42,7). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Conclusion: Our data show that the expression of CD200R, CD95, and CD95L, as well as concentration of sDC200R was significantly influenced by cardiac surgery. This implies the role of these membrane molecules in the cell regulation – inhibition and apoptosis following cardiac surgery.

2. Úvod

Současná doba je zatížena vzrůstajícím počtem lidí, kteří trpí tzv. civilizačními chorobami. Snad nejvýznamněji je tento trend viditelný u chorob postihujících kardiovaskulární systém. Přibývá pacientů s klinicky se manifestující aterosklerózou, která je spojená s vysokým krevním tlakem nebo ischemickou chorobou srdeční, s jejími následky anginou pectoris, infarktem myokardu; pacientů s jiným postižením srdce – nedomykavostí nebo stenózou chlopní či kardiomyopatií. Mnohé chorobné stavy lze zvládat pomocí změny životního stylu pacienta a farmakoterapie, často kombinované, což zvyšuje zátěž pro pacienta i riziko nežádoucích účinků. Avšak ani to mnohdy nestačí a přibývají pacienti, jejichž choroba vyžaduje chirurgické řešení, ať už plánované, nebo neplánované, akutní. Se vzrůstajícím počtem operací, i přes veškeré snahy operátorů a šetrnost nových postupů a metod, stále dochází k ohrožení života pacienta v pooperačním období v důsledku nepřiměřené reakce imunitního systému vedoucí k rozvoji závažné SIRS, orgánovému selhání i smrti. Zmapování a pochopení mechanismů stojících za rozvojem SIRS dává možnost účinně zasáhnout a zvrátit výsledek zápasu o lidské zdraví i život na stranu pacienta.

2.1 KARDIOCHIRURGICKÉ ŘEŠENÍ SRDEČNÍCH CHOROB

Každá operace s sebou nese rizika různého stupně závažnosti. Může dojít i k ohrožení či poškození zdraví, v nejhorším případě pak k úmrtí pacienta. Velkou měrou se na tom podílí i reakce imunitního systému provázející chirurgický zákrok. Sám pacient může být již předoperačně zatížen rizikovými faktory, které mohou negativně ovlivnit samotný průběh operace i následnou pooperační rekonvalescenci. Jsou jimi např. věk, pohlaví, obezita, vysoký krevní tlak, diabetes mellitus, zánětlivá onemocnění, malnutrice, abúzus alkoholu, drog aj. Dalším faktorem nesoucím riziko je samotný průběh operace. Záleží na zvoleném operačním postupu – klasickém či miniinvasivním, na použití/nepoužití mimotělního oběhu (MO), použití biokompatibilních materiálů, zvolené anestezii, nutnosti podání krevních derivátů, medikaci, kardioplegie, hemofiltraci prozánětlivých cytokinů, depleci lymfocytů aj. Trendem v chirurgii je omezit operační zátěž pacienta na možné minimum a tím snižovat, či dokonce zcela předcházet rozvoji patologické zánětlivé reakce.

2.2 TYPY SRDEČNÍCH OPERACÍ

Výběr operačního zákroku záleží na druhu srdečního onemocnění a možnostech chirurgického řešení. Rozhodnutí je pak vždy na operujícím chirurgovi, který však současně musí respektovat přání pacienta.

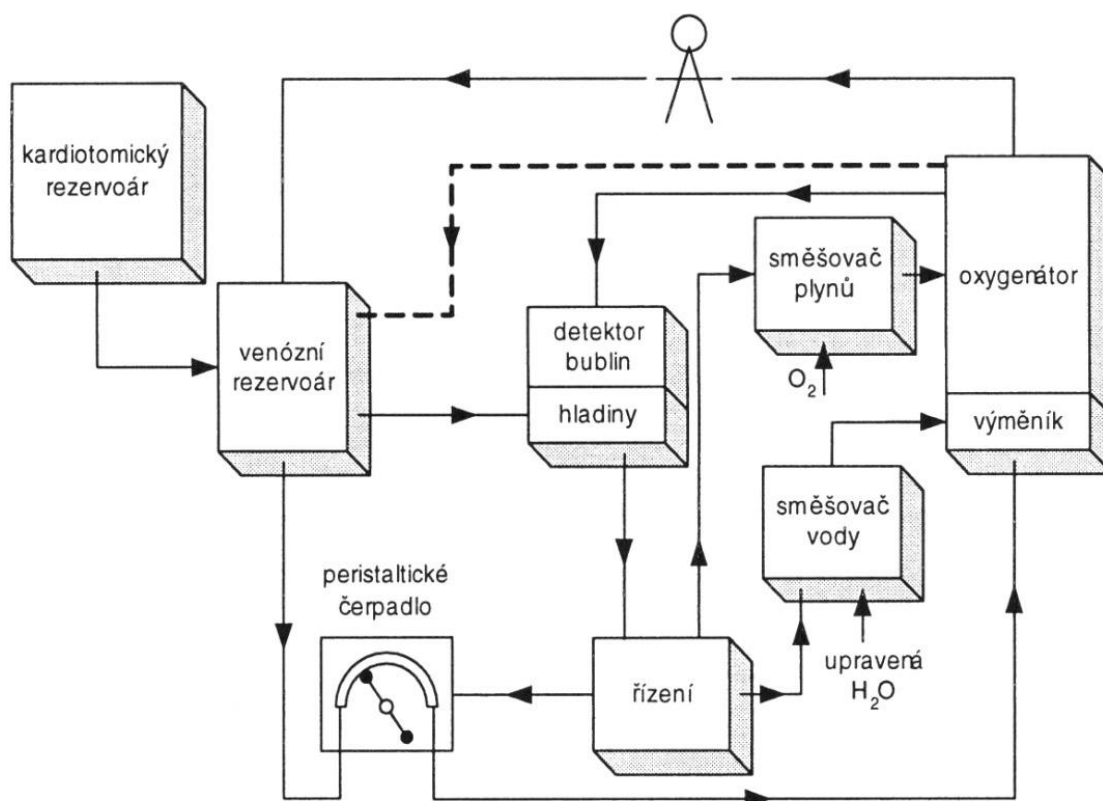
Mezi hlavní typy operací patří operace s použitím mimotělního oběhu a operace bez použití mimotělního oběhu. Přístup k srdci pak může být volen cestou mediální sternotomie, tj. přístup přes hrudní kost, nebo cestou miniinvazivní, mezižeberním prostorem.

Ačkoli jsou popsána nižší rizika pooperačních komplikací u miniinvazivních operací a zákroků bez použití mimotělního oběhu, nemusí být pro daného pacienta použití těchto typů operací vhodné a bezpečné a tento bude jednoznačně profitovat z klasické operace s použitím mimotělního oběhu.

2.2.1 Operace s použitím mimotělního oběhu

Výkony s klasickým přístupem mediální sternotomií se provádí na tzv. zavřeném či tzv. otevřeném srdci, dle indikace. Při tzv. operacích na otevřeném srdci je nutné napojit pacienta na mimotělní oběh a srdce zastavit. Nejčastěji se tak děje v normotermii nebo řízené celkové mírné hypotermii (do 35 °C). Řízenou hypotermií se zvyšuje ochrana buněk, neboť se jí snižují nároky buněk na energii a kyslík. Ochlazení myokardu, prováděné během srdeční zástavy, je zajištěno přímým chlazením studeným kardioplegickým roztokem podaným do věnčitých tepen a případně ledovou tříští aplikovanou přímo na srdeční povrch. Okamžitého zastavení srdce se docílí zastavením elektromechanické aktivity myokardu kardioplegickým roztokem, kterým je myokard současně i chráněn během srdeční zástavy. Vysokou koncentrací K^+ v roztoku je srdce zastaveno v diastole, nedochází k repolarizaci buněčné membrány kardiomyocytů. Je možné volit kardioplegii krystaloidní (studenou) a krevní (studenou/teplou). Před vlastním zastavením srdce je pacient napojen na mimotělní oběh (MO), který slouží jako dočasná náhrada funkce srdce a plic. Pomocí MO se zajišťuje cirkulace a okysličování krve, udržení acidobazické rovnováhy, s možností regulace teploty. Zařízení pro MO se skládá z krevních rezervoárů, oxygenátoru, výměníku tepla, čerpadel, kanyl, filtru a monitorovacích zařízení (1).

Princip MO – před připojením pacienta se systém naplní krystaloidními a koloidními roztoky (tzv. priming). Přestože dojde během operace k hemodiluci (tj. snížení hematokritu), krev lépe proniká kapilárami a zabezpečuje tak dostatečné zásobení tkání krví. Následuje zapojení pacienta na MO. Žilní krev pacienta se odvádí buď jednou (společnou) žilní kanylou z pravé síně a dolní duté žíly, nebo dvěma kanylami, které jsou zavedeny do horní a dolní duté žíly, do přístroje pro mimotělní oběh. V oxygenátoru se krev okysličí a pumpou je vháněna zpět do tepenného řečiště operovaného kanylou zavedenou nejčastěji do ascendentní aorty. V průběhu operace, musí být podáván heparin, k zabránění srážení krve v přístroji. Účinek heparinu se po operaci ruší podáním protaminsulfátu (obr. 1).



Obr. 1 Blokové schéma mimotělního oběhu

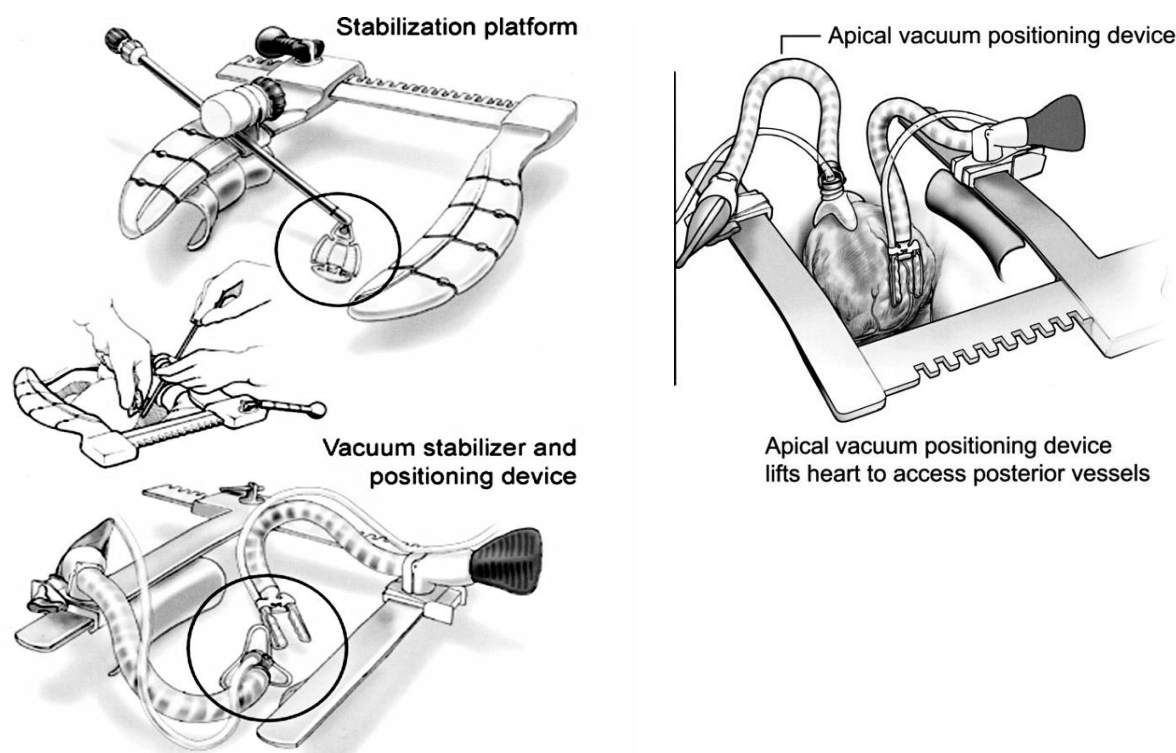
Schéma zapojení mimotělního oběhu (převzato ROZMAN, Jiří. Elektronické přístroje v lékařství. Praha: Academia, 2006. Česká matice technická (Academia). ISBN 80-200-1308-3; s 374).

2.2.2 Operace bez použití MO (tzv. off-pump operace, tzv. operace na bijícím srdci)

Při tzv. operaci na bijícím srdci, tj. bez použití mimotělního oběhu, je během vlastního výkonu nutné omezit pohyb a zafixovat srdce ve vhodné pozici, aby mohlo dojít k přesnému provedení zákroku. K tomu se využívají speciální fixátory a stabilizátory.

Dle studií je off-pump operační technika méně zatížena rozvojem imunitní zánětlivé odpovědi, a tím i možnými vážnými zánětlivými komplikacemi (2, 3). Opakovaně se potvrzuje, že je ve srovnání s klasickou operací snížena např. exprese mRNA pro TNF α , IL10, IL8, PECAM, Mac-1, hemoxygenázy HO-1, tvorba ROS, a naopak se zvyšuje koncentrace solubilního receptoru sTNFR1 a sTNFR2 (4, 5). Ovšem ne všechny studie toto potvrzují. Mnohé nezaznamenávají výraznější rozdíly v rozvoji zánětlivé odpovědi, koncentracích zánětlivých markerů jako např. CRP, IL-6, MPO (myeloperoxidáza) (6, 7). Je otázkou, nakolik jsou měřené hladiny ovlivněny použitím materiálů či medikací i způsobem měření markerů – zda je krev odebírána v koronárním sinu, z cirkulace atd. Zdá se však, že funkce neutrofilů je výrazně alterovaná i při použití této techniky. Roste exprese CD11b, CD18 a CD62L, maxima dosahuje 3. den, ale snižuje se uvolňování CD62L v reakci na PAF a fMLF, stejně tak je snížena produkce superoxidu.

Je ovšem všeobecně přijímáno, že off-pump operace je spojena s menším rizikem rozvoje silné zánětlivé odpovědi (8; obr. 2).



Obr. 2 Stabilizační zařízení při operaci na bijícím srdci

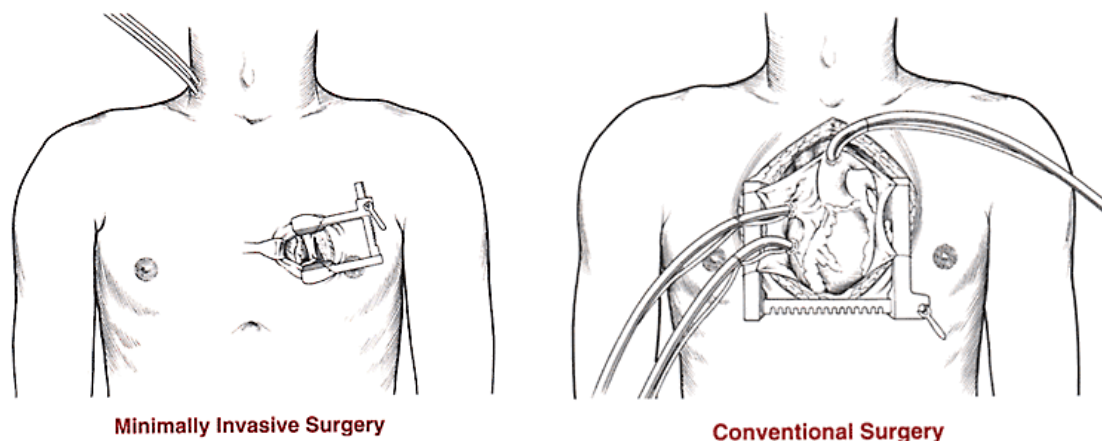
Stabilizační systém, který umožní bezpečně provádět zákrok na bijícím srdci (<http://circ.ahajournals.org/content/109/10/1206>).

2.2.3 Miniinvazivní operace

Jedná se o chirurgické výkony z menších operačních přístupů. Je možno provádět minitorakotomie, videoasistované, videoskopické a robotické operace.

Mezi miniinvazivní srdeční operace jsou ale také v kardiochirurgii zařazovány operace s použitím miniaturizovaného MO bez žilního rezervoáru (9). Další odlišností od klasického MO je i kratší délka a menší průměr hadicového systému. Objem tohoto systému MO je cca 200–650 ml, zatímco klasického MO až 1600 ml.

Výsledky potvrzují, že využití těchto miniaturizovaných technik s sebou přináší benefity pro pacienta v podobě nižší zánětlivé odezvy i následných možných pooperačních komplikací (10). Je snížen oxidační stres, CRP (C reaktivní protein), CK-MB (kreatinkináza MB /muscle, brain/ frakce), troponin T. Některé studie pak dokládají, že je oproti operaci klasické snížena také tvorba IL-6, TNF α (11–13; obr. 3).



Obr. 3 Porovnání miniinvazivního a klasického kardiologického zákroku

Porovnání operačních přístupů a polí při miniinvazivním a klasickém chirurgickém zákroku na srdci. Operační vstup je u miniinvazivního postupu výrazně redukován. (<http://www.cts.usc.edu/minimallyinvasivecardiacsurgery.html>)

2.3 FARMAKOLOGICKÉ OVLIVNĚNÍ ORGANISMU, VLIV ANESTEZIE NA ROZVOJ ZÁNĚTLIVÉ POOPERAČNÍ REAKCE

Jak již bylo zmíněno, rozvoj zánětlivé reakce v operačním a pooperačním období lze ovlivnit i použitými léčivými a druhem anestezie (14). Anestetika jako např. Sevofluran suprimují produkci prozánětlivých cytokinů, jakými jsou IL-6, IL-8 a TNF α , stejně tak i expresi PECAM-1 (15, 16). Propofol upravuje krevní průtok. Při jeho podání jsou zaznamenány nižší hladiny vznikajících ROS a prozánětlivých cytokinů produkovaných makrofágy, snižuje fagocytózu atd. (17). Látky podávané na tlumení bolesti, např. morfin, inhibují fagocytózu a oxidační vzplanutí, proliferaci a aktivaci makrofágů. Dále také produkci protilátek a snižují produkci Th1 cytokinů a aktivitu NK buněk.

Z dalších podávaných látek se na zmírnění zánětlivé odpovědi a jejího dopadu na organismus zmiňují hlavně kortikosteroidy. Nepanuje jednotný názor na jejich preventivní podávání pre- či v době operace. Prokazatelně snižují zánětlivou odpověď, snižují syntézu např. IL-6, IL-8, a naopak zvyšují syntézu a uvolnění IL-10 (18, 19). Působí preventivně proti vzniku atriálních fibrilací. Je ovšem nutné zvážit riziko imunosuprese, možného krvácení do

trávicího traktu či hyperglykémii. Krom kortikoidů je možné použít i proteinázové inhibitory (aprotinin), které redukuje hladiny TNF α , MCP-1 a prokalcitoninu (20). Předoperační podání kyseliny acetylsalicylové snižuje hodnoty 8-iso-PGF2 α (8-iso-prostaglandin F2 α , jedná se o isoprostan a slouží jako marker peroxidace lipidů, tj. oxidačního stresu) a CRP (21, 22). Využívány jsou i inhibitory cyklooxygenázy, látky neutralizující volné radikály v podobě vitamínů či N-acetylcysteinu. Prokázány jsou i pozitivní účinky podávání PUFA (polyunsaturated fatty acid) (23). Bylo testováno podání rybího oleje, který obsahuje n-3 PUFA, při jeho perioperačním podání v podobě 3 krátkých infuzí dochází k poklesu aktivace imunitního systému a snížení systémové zánětlivé odpovědi. Nedochází k výraznějšímu nárůstu syntézy IL-6.

Druh anestézie, použitých farmak, stejně jako vedení pooperační péče je však prakticky stejné u všech zmíněných typů srdeční operací.

Zkoumají se i další látky, které mají potenciál tlumit zánětlivou odpověď, a tím ochraňovat pacienta, např. necitin 1, který zabraňuje nekroptóze, tedy sestavení nekrozómu inhibicí RIP-1, evasin 3, který se váže na chemokiny CXCL, snižuje influx neutrofilů a vznik ROS (24–26). I přes tyto snahy se však zánětlivá reakce rozvíjí, záleží ovšem na její síle, zda zůstává lokalizovanou, nebo zda se mění na systémovou, která může vést k ohrožení zdraví i života pacienta.

Je snahou pooperační stav pacienta ovlivnit již v předoperačním období a v průběhu operace.

Závažnou systémovou zánětlivou odpověď charakterizují tato kritéria:

- horečka $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo hypotermie $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$
- tachykardie s tepovou frekvencí > 90 tepů/min
- tachypnoe, hyperventilace s dechovou frekvencí > 20 vdechů/ min nebo $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg
- leukocytóza nebo leukopenie – leukocyty $> 12 \times 10^9$ nebo $< 4 \times 10^9$

2.4 NEIMUNITNÍ ODPOVĚĎ ORGANISMU NA OPERAČNÍ TRAUMA MODULUJÍCÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ

Reakce na chirurgický zákrok je komplexní, nezahrnuje pouze aktivaci imunitního systému, i když v konečném důsledku vlivem vzájemného propojení ji silně ovlivňuje. Během a po chirurgickém zákroku je aktivováno mnoho systémů a kaskád. Dochází např. k aktivaci koagulační a fibrinolytické kaskády, tím i ke zvýšení hladiny trombinu, proteinu C, D-dimerů atd., jež následně modulují odpověď imunitního systému. Důležitou součástí reakcí je také aktivace kalikrein-kininového systému. Dochází ke vzniku molekul oxidačního stresu (volné radikály kyslíku/ROS a dusíku/NOS), hemolýze, syntéze a uvolňování cytokinů, kininů z aktivovaných tkáňových buněk, fibroblastů či endotelových buněk. Je však přítomna i aktivace neuroendokrinní osy, vyplavují se stresové hormony, zvyšuje se spotřeba kyslíku a urychluje metabolismus, což je doprovázeno mobilizací substrátů a syntézou nových. Dochází k depleci glykogenu a glukózy, metabolické procesy se obrací k lipolýze za vzniku glycerolu, jenž je substrátem pro syntézu glukózy. Jsou také mobilizovány glukogenní aminokyseliny. Tento stav také provází aktivace fosfolipázy A2 s následnou produkcí kyseliny arachidonové, která podléhá působení cyklooxygenáz za vzniku prostaglandinů, tromboxanu, a lipooxygenázy, což vede k produkci leukotrienů. Zvýšená je také hladina laktátu, haptoglobinu, volného hemu atd.

Z neimunologických klinických známek měnících svou dynamiku a odrážejících stav a možné poškození orgánů a zánětlivé odpovědi můžeme jmenovat např. změny srdeční frekvence, ejekční frakce, uvolnění srdečních biomarkerů – troponin, CK-MB, pro-brain natriuretický peptid, o ledvinné funkci vypovídá glomerulární filtrace – oligurie, ztráta minerálů. O funkci plic pak vypovídá např. snížená saturace arteriální krve kyslíkem atd. V neposlední řadě též dochází k iontové dysbalanci (27–29).

2.4.1 Aktivace hypotalamo-hypofyzární osy a produkce hormonů

Důležitou součástí peri- a pooperačního stavu je aktivace hypotalamo-hypofyzární osy, jež přijímá informace z periferie ze somatických i autonomních nervových vláken, která jsou při operaci drážděna mechanicky i chemicky, a to vzniklými cytokiny (IL-1 β , TNF α , IL-6), ROS aj. V důsledku toho vzrůstá sekrece hormonů hypofýzy – růstového,

adrenokortikotropního, prolaktinu, stejně tak β -endorfinu a arginin vazopresinu s antidiuretickým efektem. Nadledviny pak produkují ve zvýšené míře katecholaminy, kortizol a aldosteron. Pankreas zvyšuje produkci glukagonu. Roste i tvorba reninu v ledvinách. Stejně tak je větší obrát tyreotropních hormonů, prokalcitoninu atd. (30, 31). Naopak je zaznamenáván pokles sekrece inzulinu a pohlavních hormonů – testosteronu a estrogeneru (32).

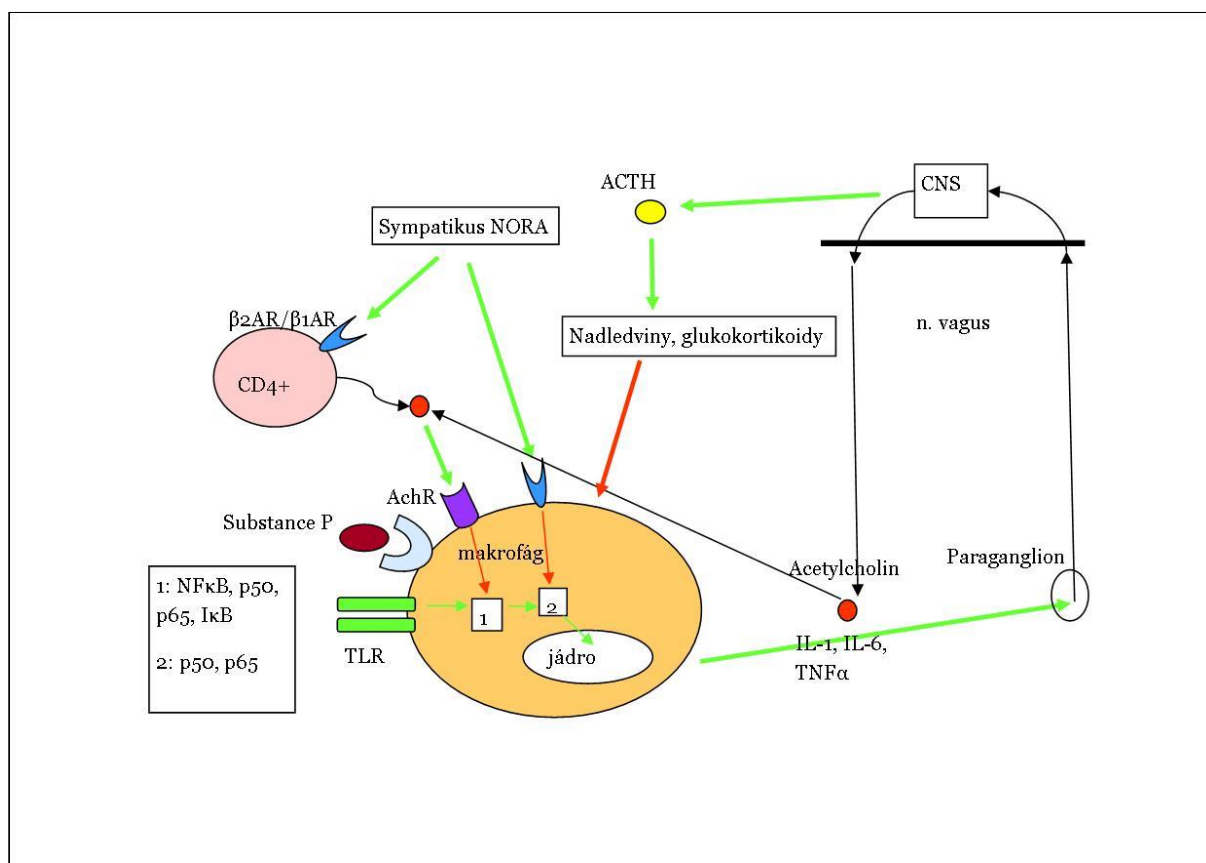
Katecholaminy ovlivňují sympatikus, zrychlují srdeční frekvenci, zvyšují krevní tlak. Renin aktivuje přeměnu angiotensinu I na angiotensin II, aldosteron zvyšuje exkreci draslíku a zadržování tekutin, čímž zvyšují i krevní tlak, glukagon se zaslouží o odbourání glykogenu v játrech a zvýšení hladiny glukózy. Imunitní systém je modulován i těmito změnami, jelikož buňky imunitního systému nesou na svých površích receptory pro hormony a neurotransmitery. Ty tak mohou ovlivňovat jejich funkci, aktivitu, ale také sekreci cytokinů. Tento jev je dobře patrný u působení kortikoidních hormonů na imunitní systém, kdy dochází k útlumu antigen prezentujících buněk (APC) a Th1 lymfocytární odpovědi s přesunem k Th2, rostou hladiny IL-4, IL-10, je utlumena syntéza IL-1 β , TNF α , INF- γ aj.

Katecholaminy ovlivňují β adrenergní receptory (β -AR), které jsou exprimovány buňkami imunitního systému (monocyty, lymfocyty aj.) (33). Např. stimulace β 2-AR inhibuje cross-prezentaci antigenu dendritickými buňkami, inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů i uvolnění HMGB1 (high-mobility group box-1). Dále také aktivace β 2-AR po stimulaci LPS (lipopolysacharid) snižuje sekreci prozánětlivého cytokinu IL-18 periferními mononukleáry. Je zde ovšem subtyp i β 1-AR, jehož stimulace může mít prozánětlivé působení. Na monocitech aktivovaných LPS zvyšuje IL-1 β sekreci (34, 35). Neurologické působky např. substance P stimuluje makrofágy a produkci TNF α a IL-12. Je tedy patrné, že existuje velmi silná provázanost systému endokrinního a imunitního.

2.4.2 Zánětlivý reflex závislý na vagovém nervu

Mechanické či chemické dráždění parasympatiku aktivuje aferentní vagální cesty. Signál je přenášen do viscerosenzitivního nucleu tractu solitarii a visceromotorického dorzálního jádra vagu. Aktivace postganglionární eferentní cesty vede k uvolnění acetylcholinu na periférii, který se váže na α 7 podjednotku nikotinového receptoru pro acetylcholin na buňkách imunitního systému, což inhibuje jejich aktivitu (36). Dochází ke

snížení uvolnění a syntézy $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-8 , HMGB1 a IL-18 díky inhibici translokace $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (37). Je zde tedy patrná stejná provázanost mezi imunitním a nervovým systémem, jaká byla popsána u systému hormonálního (obr. 4). Na operační trauma tedy reaguje celý organismus ve snaze vyrovnat se s traumatem a navrátit se zpět k rovnováze s co nejmenšími následky.



Obr. 4 Nástin cross-talku nervového a imunitního systému

Zánětlivý reflex je obousměrnou komunikací mezi nervovým systémem a adaptivní i vrozenou složkou imunitního systému – nervová vlákna jsou ovlivňována cytokiny produkovanými imunitními buňkami (makrofágy, CD4^+ T lymfocyty aj.). To vede k aktivaci vyšších nervových center a produkci ACTH (adenokortikotropního hormonu) a acetylcholinu. ACTH stimuluje nadledviny k tvorbě kortizolu, který moduluje aktivitu imunitního systému. Acetylcholin může být též produkován CD4^+ T lymfocyty po stimulaci noradrenalinem (NORA), který se váže na receptory $\beta_2\text{AR}/\beta_1\text{AR}$ (ty jsou exprimovány i makrofágy). Acetylcholin vazbou na receptor AchR podporuje přepis genů pro cytokiny ovlivňující nervový systém.

2.5 ISCHEMICKO-REPERFUZNÍ (I/R) SYNDROM

V průběhu jakéhokoliv chirurgického zákroku dochází k lokální ischemii. Ischemie myokardu se u operace srdce rozvíjí po zaklampování aorty, čímž se zabrání toku krve do koronárních tepen. Jelikož tento stav vede k poškození tkání, které může být i nevratné, je nutné chránit srdeční sval před jejími následky. Je mnoho cest více či méně účinných, jak zabránit výraznějšímu poškození srdečního svalu. Používají se různé typy kardioplegie – např. hypotermická krystaloidní nebo studená krevní, s odlišným chemickým složením použitých roztoků. Kardioplegický roztok se může podávat buď antergrádně do kořene aorty, či přímo do koronárních ústí, nebo retrográdně do koronárního sinu. Do kardioplegického roztoku je stejně tak možné přidat i další látky jako inzulin či glukózu. Je možné též přidat histidin, blokátory kalciových kanálů – diltiazem, antagonisty endotelinového receptoru, glutamát, aspartát, pyruvát aj. (38–42).

Po uvolnění svorky na aortě je krevní oběh v koronárním řečišti obnoven, srdce je reperfundováno krví bohatou na kyslík a živiny, v níž se nachází i složky imunitního systému aktivované průchodem přes extrakorporální oběh. Klinicky se může I/R syndrom projevit arytmií, nízkým srdečním výdejem nebo ischemií myokardu. V krvi operovaných je pak často zvýšen CK-MB a/nebo troponin jako markery poškození myokardu.

2.5.1 Reperfuzně-ischemické poškození tkání na buněčné a molekulární úrovni

Operační zákrok je spojený s reperfuzně-ischemickým poškozením tkání. Ve fázi ischemie dochází k hypoxii buněk a rozvoji acidózy. Je snížen membránový potenciál, dochází k buněčnému edému, dezintegraci cytoskeletu, redukuje se množství ATP a ostatních substrátů, které jsou zdrojem a zásobárnou energie. Klesá množství substrátů snižujících oxidačních stres, tj. antioxidantů – glutationu, α -tokoferolu, je snížena i recyklace vitamínu C (43). Závažné je poškození buněčných organel, hlavně pak poškození mitochondrií s narušením funkce dýchacího protonového řetězce, který se stává zdrojem volných kyslíkových radikálů a nedostatečně vytváří ATP. V hypoxickém prostředí je i nižší výtěžnost ATP z β -oxidace mastných kyselin a glykolýzy. Zpracování glukózy je při ischemii anaerobní

a získají se pouze 2 molekuly ATP za vzniku laktátu, zatímco v aerobním prostředí je zisk 36 molekul ATP. Nitrobuněčná koncentrace glukózy v anaerobním prostředí rychle klesá, proto je nutný přísun z extracelulárního prostředí. Buňky tedy zvyšují expresi transmembránových transportérů GLUT-1 a GLUT-4, aby zvýšily vychytávání glukózy. Společně se snížením koncentrace ATP se hromadí AMP (dochází ke snížení cAMP), jehož metabolitem je hypoxantin, tedy substrát pro xantinoxidázu, která je aktivovaná při následné reperfuzi. Během reakce hypoxantinu s xantinoxidázou dochází ke zvýšené tvorbě ROS (44).

Hypoxie také narušuje iontovou homeostázu, za kterou stojí i nedostatek ATP, který reguluje funkci napěťových transmembránových kanálů (Na^+/K^+ ATPázový, ATP-dependentní Ca^{2+}). Dochází k selhání aktivního transportu iontů v cytosolu, ale i v organelách. Uvnitř buňky se zvyšují koncentrace Na^+ , H^+ a Ca^{2+} iontů, stejně tak laktátu z anaerobní glykolýzy, zatímco K^+ a Mg^{2+} je ztráceno, dochází k efluxu, což narušuje membránovou repolarizaci i generování akčního potenciálu (45). Influx zmíněných iontů stojí např. za buněčným edémem a Ca^{2+} stojí za modifikací proteinových struktur, degradací fosfolipidů a mitochondriální dysfunkcí (46, 47). Vzhledem ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} v buňkách doprovází tvorba pyrofosfátových komplexů a kyseliny močové, které řadíme mezi endogenní vzory DAMP (danger/damage associated molecular patterns), mezi něž patří také již výše zmíněný eflux K^+ . DAMP jsou následně detekovány NOD-like receptory, což vede k sestavení inflamazómu, aktivaci kaspáz 1, 5 a produkci IL-1 β a IL-18 z jejich inaktivních proforem. V ischemickém prostředí se také zvyšuje přepis genů, jejichž produkty jsou např. HSPs (heat shock proteins), HIF-1 α , tyto produkty následně zvyšují expresi NOS, GLUT-1 aj. Kinázy, které stojí za přepisem – MAPK a HSF-1, jsou aktivovány i prostřednictvím působení ROS, jejichž koncentrace pak dále v období reperfuze narůstá. Ischemizace tak silně zasahuje do funkcí imunitního systému.

2.5.2 Reperfuze a reperfuzní poškození tkání

Při operaci dochází po fázi ischemie k rychlé reperfuzi, která s sebou přinese do tkání dostatek kyslíku a substrátů pro výrobu ATP a výživu buněk. Reperfuze je také provázena změnami pH v buňkách a tkáních, snahou organismu je pH vrátit do fyziologických hodnot (48).

Normalizace pH je založená na zvýšení H^+ gradientu a na Na^+ výměně iontů – Na^+/H^+ , Na^+/HCO_3^- , čímž ale dochází k další kumulaci Na^+ v buňkách. Může dojít i k paradoxnímu zvýšení pH. Je totiž narušen transport Ca^{2+} iontů i u endoplazmatického retikula, za čímž stojí Ca^{2+} ATPáza endoplazmatického retikula (SERCA), neboť je sice dostupné množství živin i minerálů, ale ještě stále není dostatek ATP. Tento stav je provázen efluxem iontů Ca^{2+} z endoplazmatického retikula, a nejen to, Na^+/Ca^{2+} transportér na buněčné membráně se dostává do reverzního módu, takže dále vzrůstá intracelulární hladina Ca^{2+} a zvyšuje se myofibrilární kontraktilita (49, 50). Vysoká koncentrace Ca^{2+} stojí i za otevřením mitochondriálních pórů a aktivaci intracelulárních proteináz – kalpainu, což ve výsledku znamená větší křehkost buněčných struktur, hyperkontrakturní a nekrozu buněk. Dochází k tzv. „přeplnění“ srdce vápníkem, což může vést k jeho zástavě v systole (51).

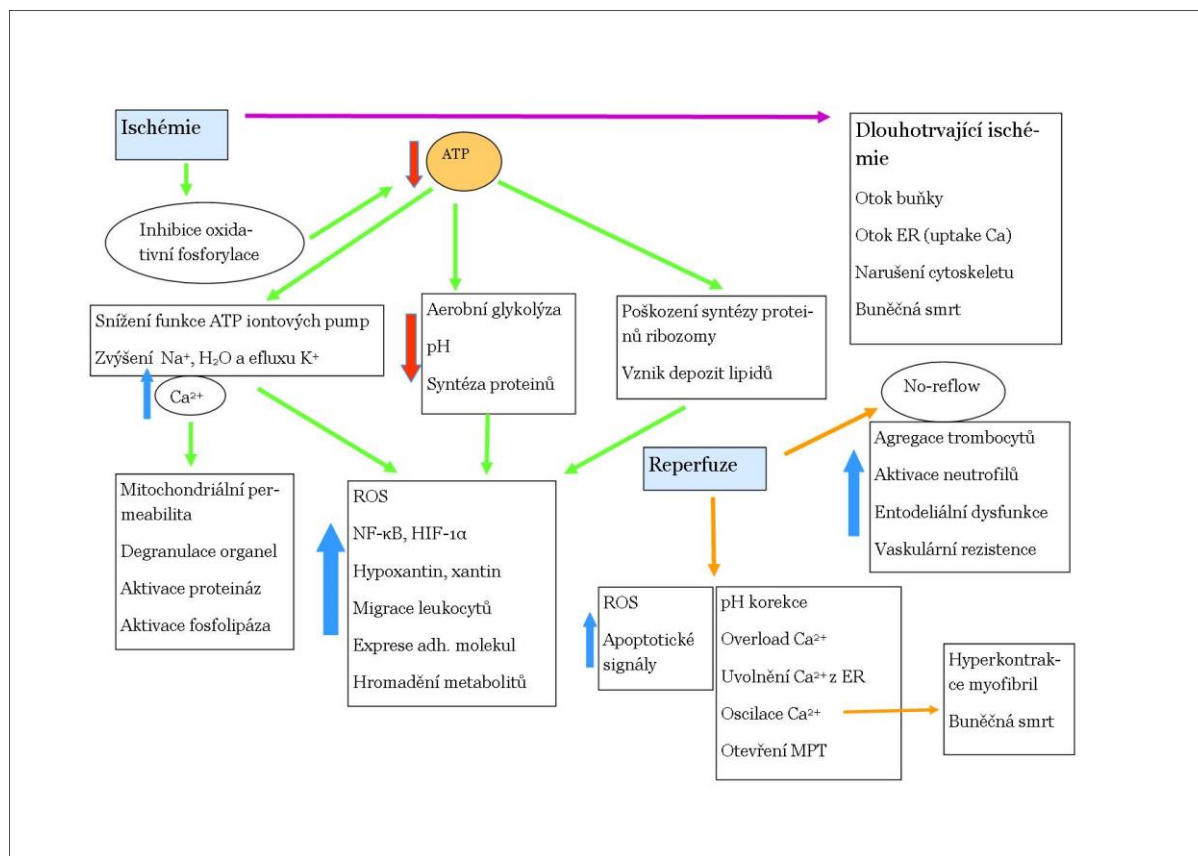
V době ischemie též vznikalo množství metabolitů a intermetabolitů, jež jsou při reperfuzi roznášeny krevním oběhem do těla a mohou dále reagovat s volnými radikály, které se ve zvýšené míře tvoří již v prvních minutách reperfuze, kdy dojde k náhlému přísunu kyslíku. Do jejich produkce je zapojena xantinoxidáza, superoxiddismutáza aj. Vysoká hladina Ca^{2+} společně s ROS se „šíří“ přes gap junction a zasahují tak další okruhy tkáně (52). Tyto okolnosti, stejně jako ischemie, negativně působí na mitochondrie, které jsou poškozeny. Jejich poškození provází uvolnění cytochromu C, který je aktivátorem vnitřní cesty apoptotického procesu mechanismem aktivace kaspáz 1 a 9 (štěpí prokaspázu 3 a 7), které jsou potřebné ke štěpení proIL-1 na funkční IL-1 β . Následují buněčné změny – nekroza, apoptóza aj. K normalizaci Ca^{2+} a ATP dochází cca 30–60 minut po reperfuzi (47; obr. 5). Dalším problematickým prvkem vedoucím k poškození tkání je i nedostatečná produkce NO endotelem. NO má totiž krom vazodilatační funkce vliv i na neutralizaci volných radikálů, snižuje agregaci trombocytů a adhezi leukocytů na endotel (45).

Na druhé straně dochází ve fázi reperfuze ke zvýšené aktivitě iNOS za vzniku peroxinitritů, dochází k peroxidaci lipidů, a tím i výrazné depleci glutationu a jiných antioxidantů. Ischemie a reperfuze však nepostihuje jen srdeční sval, ale celý organismus (další orgány gastrointestinálního traktu, ledvin či plic), kde jsou částečně omezeny dodávky okysličené krve, jak již bylo v textu zmíněno. Dochází k aktivaci imunitního systému jak vzory asociovanými s poškozením/nebezpečím DAMP, ROS vznikajícími při I/R, tak i s patogeny asociovanými vzory PAMP (ischemické poškození střeva vede k narušení bariérových funkcí a průniku bakterií z GIT).

Vzory DAMP i PAMP aktivují Toll like receptory – TLR-2 a TLR-4. Tím je stimulována i exprese adhezních molekul – P a L selektinů, ICAM-1, PECAM. Je podpořena produkce TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, tromboxanu 2 (53–55). Dopady způsobené I/R zraněním mohou být zmírněny podáním antioxidantů, modulací funkce imunitního systému např. podáním antagonisty IL-1Rc, antiIL-1 β , sTNFR, antiTNF α či aktivátorem PKC ϵ a inhibitory PKC δ , při jejíž aktivaci volnými radikály roste tvorba adenosinu a dalších volných radikálů (56, 57).

2.5.3 No reflow fenomén – neobnovení průtoku cévou

Akumulace neutrofilů a trombocytů, otok endotelu, ztráta endotelové odpovědi na vazodilatátory, společně s nižší produkcí NO při endoteliální dysfunkci a zvýšenou tvorbou vazokonstrikčního endotelinu, vedou k no-reflow fenoménu v mikrovaskulárním řečišti. Utvořená trombocyto-fibrino-neutrofilová depozita působí zúžení, až uzavěr cévy a neumožní tak distribuci krve do tkání. Na no reflow fenoménu se dále podílí i intersticiální otok a otok okolních buněk, v tomto případě kardiomyocytů, které zvenčí zužují, až uzavírají průsvit cév. Pro snížení rizika no reflow se často podávají vazodilatátory adenosin, nitroprusid a verapamil. Riziko no reflow fenoménu a poškození endotelu snižuje i podání antioxidantů (58).



Obr. 5 Ischemicko-reperfuční poškození

Při ischemii dochází k inhibici oxidační fosforylace, to vede ke snížení tvorby ATP, což má další následky, viz zelené šipky. U některých jevů dojde k posílení, tj. modré šipky, u jiných k snížení, červené šipky. Reperfuze, která následuje ischemii, je spojena s jevem no-reflow a nitrobuněčnými procesy uvedenými ve schématu.

2.6 AKTIVACE KOMPLEMENTOVÉHO, KOAGULAČNÍHO A FIBRINOLYTICKÉHO SYSTÉMU – DALŠÍ REAKCE IMUNITNÍHO SYSTÉMU NA NĚJ NAVAZUJÍCÍ – ENDOTEL, KARDIOMYOCYTY

Kontakt krve s mimotělním oběhem (MO) během operace aktivuje kalikrein-kininový, komplementový systém i koagulační a fibrinolytickou kaskádu. Důležitá je provázanost jednotlivých kaskád a procesů. Mezi všemi je tzv. cross-talk. Koagulační faktory aktivují C3 a C4 faktory komplementu, faktor XIIa aktivuje klasickou cestu aktivací C1r. Společně s bradykininem a plazminem pak funguje jako aktivátor neutrofilů a endotelových buněk. Trombin u C3 deficitních myší, tedy bez přítomnosti konvertázy, dokáže aktivovat C5 do

funkčního C5a a C5b a napomoci tak sestavení komplexu C5b–C9 MAC (membrane attack complex). Naopak komplementové faktory např. C5a zasahují do koagulačních a fibrinolytických procesů. C5a a C5b–C9 posilují expresi tkáňového faktoru, který s VIIa aktivuje faktor X. Kalikrein a plazmin, stejně jako trombin, přímo aktivují C5 (59). Mnohé faktory těchto systémů pak přímo modulují i buněčnou odezvu imunitního systému. Excesivní aktivace komplementu během MO se manifestuje zvýšenou hladinou C3a a také sestavením C5b–C9 komplexu, což bývá klinicky spojeno s nutností ventilační podpory po operaci a s renální dysfunkcí. Aktivace komplementu je závislá na sestavení dvou konvertáz faktoru C3 – konvertázy klasické dráhy C4b2a a konvertázy alternativní cesty C3bBb.

V průběhu operace mohou být aktivovány všechny tři komplementové cesty, tj. klasická, alternativní i lektinová. Vazba CRP s C1q aktivuje klasickou cestu, stejně jako vazba s imunoglobulinem, ale zároveň CRP vykazuje i inhibiční vliv, a to inhibicí sestavení komplexu C3bBb stabilizovaného properdinem, což je vysvětleno tím, že se inhibiční faktor H a C4b vážící protein váže na CRP, jehož následná vazba na faktory komplementového systému jeho aktivitu tlumí. CRP tak inhibuje alternativní smyčku aktivace C3 faktoru (60).

O aktivaci komplementu, její rychlosti a masivnosti rozhoduje mimo jiné materiál, z něhož jsou vyrobeny části MO či umělé náhrady. Hydrofobní povrchy jsou rizikovější. Mají volné skupiny NH₂ a OH, které se kovalentně váží s C3. Obecně se však plazmatické proteiny relativně snadno váží na umělé povrchy. Je to právě tato proteinová vrstva, nejčastěji pak její složky – albumin, GIG-1 proteiny (G-CSF-induced gene-1 proteins), na kterou nasedá C3 a dochází k sestavení C3 konvertázy a aktivaci klasické cesty. Navíc je klasická cesta aktivována i faktorem koagulační kaskády XIIa. Vzniklý C3b navázaný na povrchy pak aktivuje v pozitivní smyčce alternativní cestu (61). V přirozeném stavu je C3b vázáno na endotel, který exprimuje inhibitory, jež ho destabilizují a zabraňují aktivaci alternativní cesty, což na umělém povrchu chybí. Není deaktivace C3b. Regulační membránové proteiny zahrnují komplementový receptor CR1 (CD35), DAF (decay accelerating factor, CD55), membránový kofaktor protein MCP (membrane cofactor protein, CD46) a CD55 (62). Tyto molekuly obsahují sekvenci SCR (short consensus repeat), jejíž aminokyseliny vytvářejí disulfidické vazby a propojují se v „řetězec perel“ a působí preventivně proti uvolnění anafylatoxinů C3a a C5a, jelikož inhibují jejich konvertázy (63). Protektin (CD59) pak zabraňuje sestavení konečného membránu atakujícího komplexu (64). Inhibičními prvky komplementového systému jsou mimo jiné i faktor H a C4b vážící protein (65, 66).

2.6.1 Propojenost komplementové – koagulační – fibrinolytické a kininové kaskády

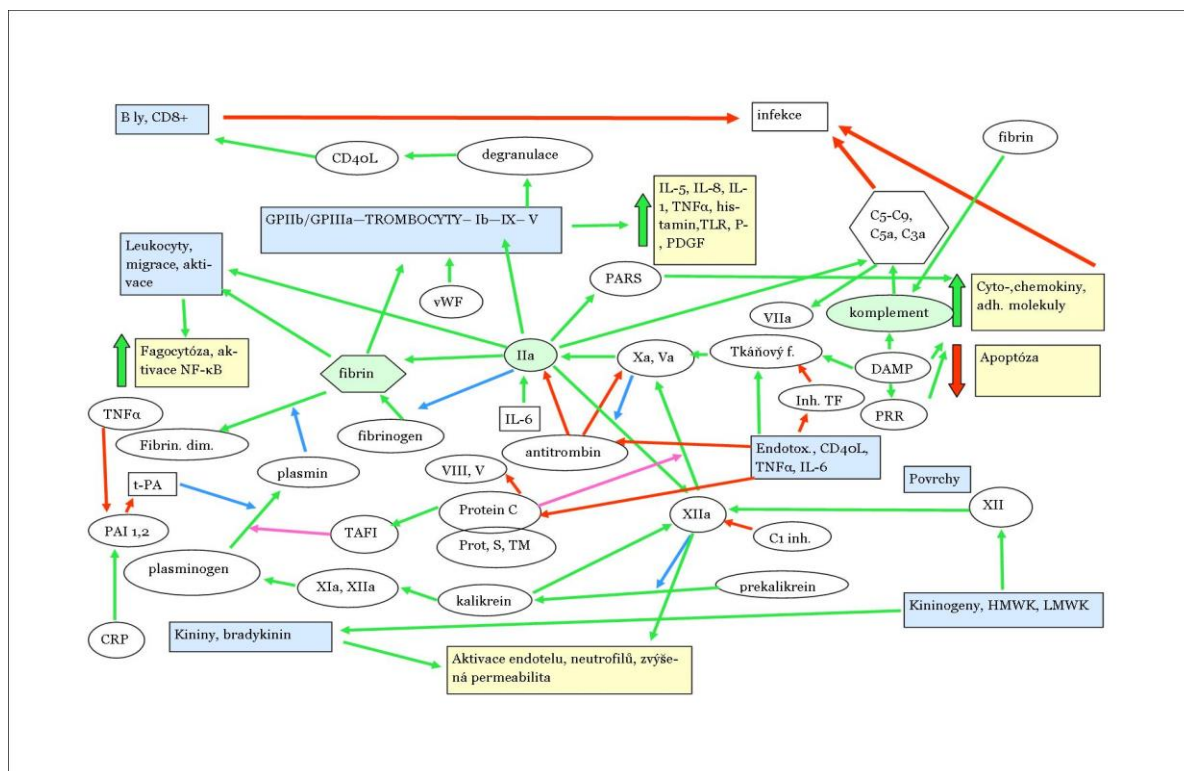
Vnitřní koagulační cesta je autoaktivovaná faktorem XII při jeho kontaktu s negativně nabitým povrchem. Vzniklý XIIa pak aktivuje i kalikrein, ale hlavně spouští koagulační kaskádu vedoucí k aktivaci protrombinu a jeho štěpení na trombin a následnou transformaci fibrinogenu na fibrin. Vnější cesta zahrnuje reakci na poškození, uvolnění tkáňového faktoru (endotel, monocyty) a aktivaci faktoru VII. Obě kaskády se „stýkají“ v komplexu $Xa/\text{destičkové fosfolipidy}/Ca^{2+}$, jenž mění protrombin na trombin. Kalikrein syntetizovaný i buňkami endotelu hraje roli i ve fibrinolytickém systému. Štěpí na površích vázaný kininogen za uvolnění bradykininu. Zvyšuje transformaci plazminogenu na plazmin, jak za spoluúčasti IXa, XIIa, tak i tkáňového aktivátoru plazminogenu (pochází z endotelu a monocytů a zároveň ovlivňuje jejich diapedézu) či urokinázy. Aktivaci monocytů a makrofágů, stejně tak jejich migraci a prozánětlivé působení v přítomnosti plazminogenu, zajišťuje plazminogenový receptor Plg-RKT, který je exprimován v koexpresi s uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor) (67). Plazmin štěpí fibrinogen na fibrin. Fibrin se váže na adhezní molekuly $\alpha 2b\beta 3$ a Mac-1 na trombocytech a leukocytech, potencuje fagocytózu, přepis NF- κ B, tvorbu chemokinů a cytokinů. S tvorbou fibrinu je také spuštěn proces fibrinolýzy (68–70).

Do celého procesu se zapojují i DAMP, jež jsou rozeznány receptory na neutrofilech, monocytech, makrofázích, endoteliích, trombocytech. To vyústí v syntézu prozánětlivých cytokinů a zvýšenou expresi adhezních molekul. Do procesu aktivace koagulace zasahuje i ke komplementu patřící MASP2 (mannan-binding lectin serine protease 2), který konvertuje protrombin na trombin přímo. Trombin (IIa) je také zvýšeně tvořen díky působení C5b–C9 a krom toho, že je součástí koagulační kaskády, působí též jako prozánětlivý faktor. Receptory pro něj nesou mnohé imunitní i endotelové buňky. Dokáže přímo aktivovat faktory C3 a C5, zvyšuje sekreci cytokinů a expresi receptorů na APC. Fibrinové monomery tvořené štěpením fibrinogenu jsou samy o sobě DAMP a při uvolnění fibrinopeptidu A je tento chemoatraktantem a aktivátorem leukocytů. Faktor XIII, který je přítomen v plazmě, trombocytech, monocytech a makrofázích, je aktivován působením MASP1 a IIa. Aktivovaný enzym pak zajistí přemostění fibrinových monomerů, váže se ovšem i na extracelulární matrix, potencuje migraci a adhezi fibroblastů, podobně pak působí na leukocyty (71; obr. 6).

Do funkce leukocytů zasahuje i fibrinolýza, jež je posilována urokinázou (uPA) a tkáňovým aktivátorem plazminogenu (tPA). Fibrinolytickým procesem vznikají fibrin degradační produkty, které mají antimikrobiální účinky. Vázaný plazmin aktivuje a atrahuje leukocyty, endotel, hlavně však trombocyty, když procházejí extrakorporálním oběhem, a indukuje ztrátu receptoru GPIIb, který je při dalším průchodu aktivuje a ony adherují k povrchu, a tak se snižuje počet cirkulujících trombocytů. Trombin, jehož koncentrace se zvyšuje, také aktivuje trombocyty k agregaci a produkci tromboxanu A₂, plazminogenu a fibrinogenu (72). V neposlední řadě se na modulaci imunitního systému podílejí i trombocyty, které v aktivovaném stavu mohou uvolňovat PDGF, TGF- β , IL-1 β , HMGB1 a RANTES. Exprimují také molekuly CD40L, TLR. Pokud jsou aktivovány těmito receptory, formují s neutrofily tzv. extracelulární síť (NET) (73, 74). Dalším místem, kde dochází k aktivaci komplementu, je povrch plynů – kyslíku a dusíku, jejichž molekuly se do krve dostávají v oxygenátoru. Hydrolýzou C3 se tvoří iC3 faktor, který se uvolňuje do krve z vazby na plyn a generuje solubilní konvertázu iC3Bb, tato vytváří C3a a C3b, ale nedochází k sestavení komplexu C5b–C9. iC3 navíc ve vazbě na CD11/CD18 aktivuje buňky imunitního systému. Vzhledem k aktivaci komplementu je nasnadě, že právě operace bez použití mimotělního oběhu jej aktivuje méně a je tedy méně zatěžující (75).

Dynamika hladin komplementu má bifázický charakter. Během časných fází je iniciována klasická a lektinová cesta a následně se připojuje i cesta alternativní. Druhá vlna přichází zhruba po 8 hodinách po operaci. Komplement je stále aktivní, ale nedochází k sestavení membránu atakujícího komplexu MAC (membrane attack complex) na rozdíl od prvního vlny. Zdá se, že zde se již uplatňují i inhibiční vlivy. Tento druhý peak C3b je provázen zvýšenou hladinou C1 inhibitoru a nezvyšuje se koncentrace komplexu C3bBb (76). Nejen při průchodu extrakorporálním oběhem je komplement místně aktivován. Samotné I/R poškození a jevy s ním spojené spouští komplementovou kaskádu – odhalení intracelulárních antigenů, uvolnění DAMP, tvorba ROS aj.

Opět mohou být aktivovány všechny tři cesty. Není výjimkou, že přirozené polyreaktivní IgM se váží na nově odhalené antigeny, dále je zvýšená exprese sacharidů stresovanými buňkami, jimiž je komplementová kaskáda aktivovaná. Sestavený komplex C5b–C9 poškozuje buňky epitelu a zvyšuje i expresi ICAM-1. Je tedy více než logické, že jsou zkoušeny přípravky blokující C3 konvertázu, receptor CR1, antiC5 či C5aR antagonisté pro snížení rizika rozvoje zánětlivé odpovědi (77).



Obr. 6 „Mapka“ zjednodušeně zachycující provázanost mezi imunitním, srážecím, kalikrein-kininovým systémem

Diagram vytvoření pro představu o komplexnosti reakcí a provázanosti jednotlivých systému, tj. komplementového, kalikreinového, srážecího, fibrinolytického aj. Zelená šipka – aktivace, červená – inhibice, modrá – pozitivní ovlivnění cesty, růžová – negativní ovlivnění cesty.

2.6.2 Endotel a ischemicko-reperfúzní poškození (I/R)

Epitel vystylající cévy, tj. endotel, je v průběhu operace srdce aktivován. Endotelie jsou více citlivé k I/R než k samotné ischemii. Endotelie jsou schopné tolerovat širokou škálu tlaku kyslíku. Vydrží tedy delší dobu bez kyslíku, zatímco reperfúze u nich aktivuje apoptózu (78). Aktivace není omezena jen na místo poškození, ale je systémová. Tento fakt přispívá k systemizaci zánětlivé odpovědi, přestupu neutrofilů do tkání atd. Aktivované endotelové buňky v systémovém řečišti uvolňují prokoagulační faktory. Zvýšením produkce NO se snižuje vaskulární rezistence. Na druhou stranu může NO působit též jako „vychytávač“ volných radikálů, a tím omezovat buněčné poškození a rozvoj zánětlivé odpovědi (79–81). Je zde ovšem problém ve zvýšené konzumaci NO při vysoké koncentraci ROS, jejichž největším producentem jsou mitochondrie. Hladina NO je dále snižována přítomností ADMA

(asymmetrical dimethylarginine), který je inhibítozem NOS. Nedostatek NO mění vazoaktivitu cév (82). Aktivovaný endotel se vyznačuje i expresí adhezních molekul, např. expresí P-selektinu vyvolává anafylatoxin C5a. Selektin je skladován v endotelových buňkách ve Weibel-Paladeho tělískách a po stimulaci C5a je okamžitě vystaven na povrch (81, 84). Integrinové a imunoglobulinové adhezní molekuly mají v expresi prodlevu (ICAM-1 exprese do cca 6 hodin po reperfuzi).

Zatímco selektinové molekuly umožňují tzv. rolling neutrofilů, integrinové molekuly je váží pevněji a připravují na diapedézu. Transmigrující neutrofilové uvolňují enzymy např. elastázu, metaloproteinázu, myeloperoxidázu, které destruuují okolní tkáň (84). Zvyšuje se množství uvolněných volných radikálů, dochází ke zvýšené peroxidaci lipidů. Je poškozována buněčná DNA a degradovány mnohé proteiny (85). Traumatizovaný endotel aktivuje jak imunitní odezvu, tak i koagulační systém – hlavně neutrofilové a trombocyty. Trombocyty jsou aktivovány kolagenem a vonWillebrandovým faktorem (86). V neposlední řadě je pak endotel i zdrojem cytokinů, jež jsou často produkovány lokálně autokrinní stimulací. Jedná se např. o prozánětlivé cytokiny TNF α , IL-8, IL-1 β aj. První zmíněný je zodpovědný za změny kontraktility kardiomyocytů a jejich apoptózu, druhý pak za infiltraci tkáně neutrofilové. Další signální molekuly produkovány endotelem jsou i prostacykliny, endotelin-1, angiotensin II, VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) atd. (87, 88).

2.6.3 Kardiomyocyty, zdroj cytokinů a dalších mediátorů

Kardiomyocyty jsou závislé na endotelu, cévy jim dodávají živiny, ale také NO, který proniká skrz endotel a reguluje jejich kontraktilitu (89). Výzkumy ukazují, že poškození endotelu koreluje s poškozením srdeční svaloviny. Kardiomyocyty a fibroblasty v srdeční svalovině jsou schopné, zvláště pak po stimulaci LPS či při ischemii, produkovat TNF α a IL-6. Fibroblasty jsou navíc, stejně jako intersticiální makrofágy, schopné produkovat IL-1 β , což je další podnět pro syntézu prozánětlivých cytokinů kardiomyocytů a rekrutování leukocytů (90). Podobně reagují i na stimulaci C5a a IL-17A, což negativně ovlivňuje kontraktilitu a relaxaci srdeční svaloviny (91). Také aktivace RAS – renin angiotensinového systému (angiotensin II) vede ke zvýšení syntézy IL-6 a TNF α . Důležitým faktorem v syntéze cytokinů kardiomyocytů je proteinkináza mTOR (mammalian target of rapamycin), jejíž

inhibice rapamycinem vede ke zvýšení sekrece prozánětlivých cytokinů. Tudiž aktivace kinázy působí protizánětlivě a je prevencí proti remodelaci levé srdeční komory (92, 93). Ischemické kardiomyocyty dále produkují bradykinin, noradrenalin, angiotensin, adenosin, acetylcholin, opioidy, jež modulují odpověď systémů na operační trauma.

2.6.4 Vybrané humorální působky, enzymy a receptory podílející se na pooperační zánětlivé reakci

Buňky, které jsou vystaveny ischemii a následné perfuzi, podléhají několika procesům, jež mají zajistit buď jejich odstranění/smrt, nebo přežití. Jedná se o procesy, jako jsou apoptóza a nekroptóza, autofagie či nekróza ischemických buněk (94). Tyto procesy jsou řízeny i změnami mikroprostředí, které ovlivňuje nejen osud tkáňových buněk, ale také aktivitu a funkce buněk imunitních. Důležitým momentem je uvolňování či syntéza látek, které mají přímý aktivační účinek na buňky imunitního systému (jedná se např. o alarminy, zánětlivé markery, cytokiny atd.), posílení či snížení exprese některých povrchových molekul, zvýšená exprese a aktivita enzymů (95).

2.6.4.1 Alarminy

Alarminy jsou endogenní molekuly za běžných okolností se extracelulárně nevyskytující, nebo pouze v malém množství. K jejich výraznějšímu pasivnímu uvolnění z buňky dochází při jejím poškození, desintegraci buněčné membrány – nekróze, nebo jsou aktivně uvolňovány z epitelu a buněk imunitního systému po jejich stimulaci (96). V době klidu plní alarminy své intracelulární funkce – např. regulace přepisu DNA, regulace hladiny nitrobuněčného vápníku, motility buněk. Tyto molekuly, v případě uvolnění do extracelulárního prostoru, jsou schopné aktivovat imunitní systém, zvláště pak jeho buněčnou nespecifickou složku (97).

Krátký přehled vybraných alarminů:

- HsP60 (v mitochondrii) a 70 (cytosol a jádro) jsou pasivně uvolňovány z nekrotických buněk, váží se na receptory TLR-4 a 2, potencují rozvoj SIRS.
- α defenziny, jež jsou syntetizovány epitelii, keratinocyty, mají přímé antibakteriální účinky, zvyšují aktivitu imunitních buněk aj. Jsou aktivně uvolňovány, negativně působí na respirační systém (napomáhají rozvoji ARDS, fibrózy) a trávicí systém vznikem nespecifických střevních zánětů (IBD).
- katelicidin je leukocytárním produktem s antimikrobiálním působením. Zesiluje odezvu imunitního systému. Aktivně je uvolňován při degranulaci, váže se na receptor FPR1 1 (formyl peptide receptor 1). Jeho zvýšená hladina se vyskytuje u cystické fibrózy, ARDS, IBD aj.
- HMGB 1 se nachází ve všech jaderných buňkách, je uvolňován pasivně, ale i aktivní sekrecí. Reguluje DNA transkripci. Působí prozánětlivě, váže se na ostatní DAMP – LPS, IL-1 α , DNA, polarizuje imunitní odpověď směrem k Th1, extracelulárně reguluje buněčnou migraci, aktivaci i proliferaci, v případě apoptózy se uvolňuje až v její druhé fázi, tj. pozdní apoptóza – nukleozomální degradace.
- S100A8/9 jsou malé vápník vážící proteiny nacházející se v cirkulujících monocytech, neutrofilech i epitelových buňkách. V extracelulárním prostoru působí prozánětlivě – zvyšují jejich migraci, adhezi, tvorbu prozánětlivých cytokinů, uvolnění myeloidních buněk z kostní dřeně aj.
- krystaly kyseliny močové aktivují sestavení NALP3 inflamazómu, a tím i proteolytické štěpení neaktivních/latentních forem IL-1 β a IL-18 na aktivní interleukiny IL-1 β a IL-18 kaspázou 1.
- IL-1 α se při aktivaci makrofágů LPS translokuje do jádra a vazbou na DNA aktivuje přepis genů. Pokud je v extracelulárním prostředí, potencuje zánětlivou odpověď.
- mtDNA, mitochondriální DNA, je prozánětlivým faktorem, jehož koncentrace reaguje na provedený chirurgický zákrok, neboť je uvolňovaná z poškozených buněk, může se také uvolnit z aktivovaných trombocytů. Dle studií nárůst mtDNA pozitivně koreluje i se zvyšováním TNF α , IL-6, IL-8 a IL-10.

Mezi alarminy je možné zařadit i EDN (eosinophil-derived neurotoxin), IL-33 a mnoho dalších (97–103).

2.6.4.2 Markery zánětu, které bývají sledovány u chirurgických zákroků, v klinice či studiích

Abychom mohli sledovat rozvoj a sílu zánětlivé odpovědi, využívají se markery, které zrcadlí imunitní odezvu. Je důležité najít skutečně vhodný marker, který je schopen zachytit změny v krátkém časovém intervalu, spolehlivě mění svou dynamiku v závislosti na aktivitě imunitního systému. Marker, ze kterého by se dal predikovat další pooperační vývoj zánětlivé odpovědi, ale také marker, který je snadno a levně stanovitelný (104, 105). Soupis markerů, které bývají měřeny při studiích, čítá mnoho položek.

Nejčastějšími sledovanými markery jsou cytokiny a jejich receptory, např. $\text{TNF}\alpha/\text{sTNFR}$, IL-1 α , IL-1 β /IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-6/sIL-6R, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-22, PAF, MIP-1 α , MIP-2 β , MCP-1, 2. Jedny z nejvýznamnějších jsou níže zmíněné:

TNF α – patří mezi časné reaktanty na poškození, infekci a induktory zánětlivé odpovědi, ale i koagulace, svalového katabolismu či uvolnění glukokortikoidů. Velmi rychle reaguje na operační zásah, a to jak zvýšením exprese, tak i následným rychlým poklesem (106).

IL-1 β – je produkován např. z aktivovanými makrofágy a endotelii, má prozánětlivé působení. Jeho působením může dojít až k hemodynamické dekompenzaci. Působí podobě jako TNF α , navíc vyvolává febrilní odezvu v předním hypotalamu prostřednictvím prostaglandinů, jejichž aktivitu podporuje. Také podporuje uvolnění endorfinů, které zvyšují počet centrálních opioidních receptorů, čímž oslabuje vnímání bolesti. Pro IL-1 β cytokiny existují dva receptory IL-1R, jenž je aktivační, a IL-1RA, který nevede signál, a soutěží o IL-1 β , který je vazbou na něj deaktivován. V případě kardiochirurgických operací se zvyšují hladiny jak samotného cytokinu, tak jeho receptoru IL1-RA (107).

Interleukin-6 – jeho produkce je indukována TNF α a IL-1 β , po zranění, operaci jeho hladina v krvi roste již za 60 minut, roste po dobu 4–6 hodin. Zdá se, že jeho hladina koreluje s rozsahem poškození tkáně během operace. Je induktorem syntézy reaktantů akutní fáze v játrech. Posiluje aktivitu neutrofilů, má na ně i antiapoptotický vliv, stejně tak na kardiomyocyty, a tak prodlužuje dobu zánětu (108). IL-6 také funguje jako prediktor rozvoje infekce (109). Jeho protizánětlivé působení pak spočívá v oslabení aktivity TNF α a IL-1 β , jelikož podporuje produkci jejich „neutralizačních“ receptorů IL1-RA a sTNFR (106, 107).

Interleukin-8 – působí hlavně jako chemoatraktant a aktivátor neutrofilů, navíc jeho hladina koreluje s uvolňováním troponinu I, tj. s poškozením srdečního svalu během operace (110).

Interleukin-12 – podporuje buňkami mediovanou odpověď a diferenciaci do Th1 subsetu. Zvyšuje aktivitu neutrofilů, ovlivňuje i koagulaci. Postoperačně se vlivem snížení počtu lymfocytů snižuje i hladina INF- γ , a tím i odpověď Th1. Pokud je podán rekombinantní IL-12, nedochází k supresi Th1 a je nižší riziko rozvoje infekčním pooperačních komplikací (111).

INF- γ – jeho syntéza je pooperačně snižena, aplikace IL-12 ji dokáže podpořit, což neplatí u syntézy IL-6 a TNF α (112, 113). Je tedy možné, že snížení exprese INF- γ je pouhou reakcí na snížení exprese IL-12. Naproti tomu se exprese INF- γ R v pooperačním období na monocitech i granulocytech zvyšuje (114, 115).

Složky komplementu – C3b, C4a, C5a, C5b–C9, které výrazně modulují reaktivitu imunitního systému, posilují prozánětlivé děje. Některé působí jako chemoatraktanty, jiné se váží na receptory imunitních buněk, které aktivují. C5b–C9 aktivuje i NF- κ B v endoteliích a zvyšuje tak expresi adhezních molekul. Komplement je aktivován velmi časně a dle všeho by mohla být inhibice komplementového systému přínosem pro pacienty podstupující kardiochirurgickou operaci (116).

Adhezní molekuly – selektiny E, L, P, ICAM-1, VCAM-1/sVCAM-1, PECAM-1 atd. podporují rozvoj zánětu umožněním extravazace imunitních buněk. Endotel zvyšuje expresi P selektinu, ICAM, sVCAM již po 2–5 hodinách po operaci, a to i pod vlivem aktivace komplementového systému. Jsou tedy známkou aktivace imunitní odpovědi (117).

Povrchové molekuly a receptory podléhají vlivům souvisejícím s operačním zákrokem (aktivace komplementu, tvorba ROS, uvolnění alarminů atd.) a dochází ke změnám v jejich expresi, ať už se jedná o posílení, či oslabení exprese. Nejčastěji se sledují změny v expresi HLA-DR, Toll like receptory, CD11a, CD11b/CD18, CD14, CD16, CD36, CD62L, CD97, CD95, TREM-1 aj., které odrážejí aktivaci imunitního systému a zánětlivé odpovědi, popř. její intenzity.

Enzymy imunitních buněk – tryptáza, elastáza, kataláza, myeloperoxidáza, metaloproteinázy jsou v průběhu zánětlivé reakce provázející operační zákrok zvýšeně exprimovány. Myeloperoxidáza a PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein) jsou časnými markery zánětu, jejich dynamika se mění již po 3–5 minutách po započetí operace (118–120).

Solubilní receptory PRR (pattern recognition receptors) CRP, PTX3

CRP patří do rodiny pentraxinů. Je receptorem pro signály nebezpečí (pattern recognition receptor, PRR) a opsonizátorem. Jeho primárním zdrojem jsou hepatocyty, je však tvořen i epitelovými buňkami dýchacích cest aj. (121). Tvoří komplex s C1q, a aktivuje tak klasickou cestu komplementu, zároveň také inhibuje alternativní a lektinovou cestu svou vazbou s inhibičním faktorem H (122). Jeho koncentrace v krevním řečišti roste i bez zjevné infekční příčiny v pooperačním období, provází i tzv. sterilní zánět. Mezi zvyšováním koncentrace CRP a vážností stavu pacienta není úměra. Není tedy možné použít jen CRP jako prediktor možných komplikací a špatné pooperační prognózy v průběhu následujících 48 hodin (123). Je však také potvrzeno, že preoperační zvýšená hladina CRP je rizikovým faktorem rozvoje zánětlivé odpovědi vyšší (124).

PTX3, pentraxin – patří do stejné rodiny jako CPR, je jejím dlouhým zástupcem. Je produkován mnoha buňkami imunitního systému, fibroblasty i endoteliemi. Silně se váže s C1q, mikroorganismy, apoptotickými buňkami, které opsonizuje. Aktivuje klasickou komplementovou cestu. Jeho vazba na faktor Cq1 navázaný na protilátky na erytrocytech může vést k hemolýze. Pokud PTX3 váže nenavázaný faktor Cq1, inaktivuje ho a inhibuje tak klasickou cestu. Je tedy možné shrnout, že PTX3 podporuje odstranění korpuskulárního materiálu, na který se váže, na druhou stranu inhibuje aktivaci komplementu v případě nenavázaného faktoru Cq1 (125, 126). Váže se také na manózu vážící protein MBL a tento vzniklý komplex aktivuje C1q a zvyšuje rozpoznávání patogenů makrofágy a dendritickými

buňkami (127). V jeho expresi ve vztahu ke kardiochirurgickým zákrokům jsou zaznamenávány změny. Expresie mRNA pro PTX3 vzrůstá po cca 4 hodinách ischemizace tkáně a vrcholu dosahuje po 16 hodinách. V plazmě je pak možné zachytit změnu hladin po cca 8 hodinách (128). Přičemž exprese nenastává v době ischemie, ale reperfuze, kdy snižuje rozsah i vážnost poškození srdečního svalu, cév. Snižuje infiltraci postiženého místa neutrofilů, množství apoptotických kardiomyocytů, IL-6 i depozit C3 atd. (129, 130). V porovnání dvou typů kardiochirurgických zákroků on a off-pump, dochází v obou případech ke zvýšení hladiny PTX3, ale v případě on-pump zákroku je změna koncentrace PTX3 větší a déle trvající (131).

Prokalcitonin – je dalším výrazným markerem probíhajícího zánětu. Má rychlejší kinetiku než CRP. Vrcholu dosahuje již 1. den, CRP den 2. Nárůst koncentrace prokalcitoninu je spojen s pooperační infekcí, SIRS, renální pooperační dysfunkcí (132).

Metaloproteinázy – degradující proteiny a kolagen v extracelulární matrix a vaskulární membráně napomáhají migraci leukocytů do tkání. V pooperační období dochází ke zvýšení exprese hlavně MMP-2, 8, 9 i 13. Zvyšování je patrné již na konci operace. Maxima hodnoty dosahují za cca 24 hodin po operačním zákroku (133, 134).

Presepsin – je solubilní N-terminální fragment povrchové molekuly CD14 (sCD14 ST), který je uvolňován do cirkulace monocyto-makrofágovou populací po jejich aktivaci mikroorganismy. CD14 váže komplexy lipopolysacharidů a lipopolysacharidy vázících proteinů (LPS-LBP) a v kooperaci s TLR4/my88D dochází k aktivaci buňky. Z membrány odštěpený komplex CD14/LPS-LBP o velikosti 55 kDa je dále proteolyticky degradován a vytváří se 13kDa sCD14 suptyp, který je využíván jako marker sepse. Jeho koncentrace se mění i v případě kardiochirurgických operací, Popov a kol., stejně tak Bomberg a kol. Sledovali dynamiku změn presepsinu a dalších markerů u pacientů, kteří podstoupili kardiochirurgický zákrok. K signifikantnímu nárůstu došlo u pacientů, u nichž byly potvrzeny infekční komplikace, a právě pacienti s vysokými hladinami presepsinu tvořili skupinu s největší mortalitou. Riziko úmrtí navíc zvyšuje i vyšší preoperační koncentrace presepsinu (135, 136).

Deriváty kyseliny arachidonové – v průběhu operace a po ní se také zvýšeně tvoří leukotrieny, prostaglandiny aj., které ovlivňují přímo cévy (ovlivňují cévní rezistanci) a kardiomyocyty, tím i krevní oběh a činnost srdce. Ovlivňují též imunitní systém a mohou

působit pro- i protizánětlivě. Kardiochirurgická operace je např. spojená s nárůstem koncentrace cysteinylových leukotrienů, hlavně u pacientů s CHOPN, a zhoršují tak pooperační stav pacientů, podporují rozvoj zánětu (137). Kardiopulmonální bypass také zvyšuje produkci tromboxanu 2, leukotrienu B4, přičemž právě jeho koncentrace koreluje s leukocyty mediovaným poškozením tkání (138).

Výčet samozřejmě zdaleka nekončí, mohli bychom najít další molekuly, substráty, které by do této podkapitoly mohly být zařazeny.

Ne všechny markery je ovšem možné sledovat v klinické praxi. Jde hlavně o jednoduchost, dostupnost, rychlost a také cenu vyšetření daného markeru. Nejvíce využívané je stále využíváno CRP a prokalcitonin společně s krevním obrazem, včetně „diferenciálu“, tj. procentuálního zastoupení lymfocytů, monocytů, neutrofilních, bazofilních a eozinofilních granulocytů.

2.6.4.3 Receptory zapojené v reakci na chirurgický zákrok s pro i protizánětlivou aktivitou

Mnohé receptory exprimované buňkami imunitního systému po vazbě se svým ligandem aktivují nitrobuněčné signální cesty, které vedou k rozvoji zánětlivé reakce.

TLR receptory rozpoznávají tzv. nebezpečné vzory, které jsou evolučně konzervativní. Jedné o PAMP, tj. mikrobiální či virové komponenty (LPS, glykany, jedno i dvouřetězcovou RNA, DNA). Jsou ovšem schopné rozpoznat i endogenní DAMP – uvolněné z nekrotických buněk (HMGB1, krystaly kyseliny močové atd.) aj. Výsledkem jejich stimulace je rozvoj a posílení zánětlivé odpovědi. V oblasti kardiochirurgie jsou sledovány dva receptory z této rodiny – TLR-2 a TLR-4. Jejich exprese se během operace a v pooperačním období mění a zdá se, že odráží i vážnost stavu pacienta. Krom buněk imunitního systému jsou TLR-2 exprimovány i na kardiomyocytech a endotelu. Zvýšená exprese na těchto buňkách a leukocytech je spojována s postischemickým poškozením a dysfunkcí levé komory (139). Expresa na leukocytech má bifázický charakter, po poklesu exprese těsně po operaci dochází k jejímu zvýšení i nad preoperační hladinu (140, 141). Dle výzkumů je patrné, že dynamika exprese není příliš ovlivněna použitou operační technikou,

mění se jen intenzita exprese (142). Naproti tomu ovšem existují i studie, které nezaznamenaly změny v expresi (143).

Kromě změny v expresi receptorů dochází i k ovlivnění jejich funkce. Je např. narušena tvorba TNF α po stimulaci TLR-4, a za určitých podmínek po stimulaci tohoto receptoru i TLR-2 je možné potencovat produkci IL-10, pokud se aktivuje cesta PI3K/Akt (144). Dochází k tomu v přítomnosti lipopeptidu Pam2, který může být systémově podán. Produkce IL-10 pak vede k podpoře diferenciaci T lymfocytů do Foxp3⁺CD4⁺T (Treg) (145). *In vitro* pokusy ukazují, že stimulace pomocí LPS a LTA (lipoteichoic acid) vede ke zvýšení exprese mRNA pro oba receptory i exprese povrchových molekul TLR-2 a TLR-4 na monocytech, pokud stimulace trvá více než 20 hodin, exprese receptorů klesá, což je možné přičíst internalizaci komplexů LTA/CD14/TLR-2 nebo LPS/CD14/MD2/TLR-4 a jeho transportu do Golgiho aparátu (146). TLR-4 exprimované kardiomyocyty mají na neutrofile chemotaktický vliv. Pokud srdeční sval exprimuje TLR-4, je u něj patrná vyšší infiltrace neutrofilů. TLR-4 má tedy důležitou roli v postischemické infiltraci myokardu neutrofilem (147). Tento receptor je na kardiomyocytech stimulovaný např. uvolněným Hsp70, jeho stimulace zvyšuje tvorbu KC (keratinocyte-derived chemokine) a MCP-1 (148).

Purinergní receptory P1 a P2 jsou spoluexprimovány na většině tělních buněk. Váží ATP uvolněné z poškozených buněk. U makrofágů a neutrofilů vyvolává tato vazba P2X7 receptoru a ATP sestavení inflamazómu NALP3 a syntézu IL-1 β (149). Chová se tedy prozánětlivě. Naproti tomu metabolit ATP adenosin reaguje s receptorem P1, např. na neutrofilech. Výsledný efekt má inhibiční charakter a zvyšuje intracelulární koncentraci cAMP. Zvýšená hladina adenosinu souvisí s tkáňovou hypoxií. Ekto-apyráza (CD39) a 5'-nukleotidáza (CD73), jež jsou exprimovány na povrchu Treg jsou zodpovědné za jeden z jejich imunosupresivních účinků. CD39 degraduje ATP a ADP na AMP a CD73 ho mění na adenosin (150, 151).

CD95 Apo/Fas a jeho ligand viz samostatná kapitola.

2.7 HOMEOSTATICKÉ MECHANISMY ZAPOJUJÍCÍ SE DO REGULACE ZÁNĚTU U KARDIOCHIRURGICKÝCH ZÁKROKŮ

V rámci zachování rovnovážného stavu je zánětlivá reakce kontrolována homeostatickými mechanismy, aby nedošlo k nadměrnému aktivování imunitního systému a nevratnému poškození tkání (152). Mezi ně patří např. cytokiny – IL-10, TGF- β , lipidové mediátory – resolviny, maresiny, PGE-2, neuromediátory a hormony – kortizol, adrenalin, acetylcholin, vazoaktivní intestinální peptid, enzymy –IDO, receptory – CTLA-4, PD-1, CD200R atd.

V krátkosti blíže k těm nejznámějším.

IL-10 je produkován např. Treg a Th2 lymfocyty, ale také i monocyty, pokud je aktivován receptor PD-1. I signalizace přes receptor pro IL-27 vede v makrofázích k produkci IL-10, dále je popsána cesta IL-10 cytokinové tvorby cestou TLR/myD88/TRIF a TLR/ERK cesta. Inhibuje produkci cytokinů a chemokinů, např. IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF α a GM-CSF, blokuje totiž aktivaci a translokaci NF- κ B do jádra, snižuje expresi kostimulačních molekul efektorových buněk, prezentaci antigenů, makrofágovou cytotoxicitu, adhezi monocytů na endotel, uvolnění ROS, napomáhá proliferaci a přežití B lymfocytů, posiluje diferenciaci T lymfocytů do tlumivých subsetů atd. (153).

TGF- β je produkován širokou škálou buněk, včetně buněk neimunitních. Kontroluje buněčnou proliferaci a diferenciaci – např. T lymfocytů do subsetu Treg Foxp3 a Th17. Dokáže indukovat apoptózu. Inhibuje syntézu cytokinů i chemokinů, makrofágovou cytotoxicitu, snižuje protimikrobiální aktivitu, zvyšuje produkci PGE-2 atd. Zamezuje uvolnění NO a H₂O₂ produkci. Snižuje prokoagulační aktivitu, expresi tkáňového faktoru atd. (154).

Mezi kontraregulační mechanismy, které mají za úkol tlumit zánětlivou odpověď, patří i již zmíněný sympatoadrenergní systém – **kortizol, adrenalin** aj.

Další látkou je **prostaglandin E**, tj. derivát kyseliny arachidonové vzniklý působením cyklooxygenáz, podporuje diferenciaci T lymfocytů do subsetu Th2 a Treg, snižuje syntézu TNF α , zvyšuje syntézu IL-6 a IL-10, snižuje expresi HLA-DR, aktivitu iNOS, proliferaci NK buněk a T lymfocytů, stejně tak maturaci dendritických buněk (155).

IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) je induktorem imunotolerance, je aktivována v zánětlivém prostředí hlavně působením IFN- γ i vazbou CD200 s CD200R. Metabolizuje tryptofan, jehož úbytek má za následek inhibici T lymfocytů. Navíc přeměňuje tryptofan na kynureniny, které suprimují T lymfocyty a jejich proliferaci. Snižují uvolnění TNF α a HMGB-1 aj. (156, 157).

Regulační lymfocyty – jedná se subsetů Tr1, Th3 a přirozené Treg exprimující transkripční faktor Foxp3. Suprimují reaktivitu imunitního systému namířenou jak proti exo-, tak endogenním antigenům a podnětům. Jsou zdrojem protizánětlivých cytokinů, hlavně IL-10, tlumí odpověď přirozené buněčné imunity. V literatuře je zachycen nárůst tohoto subsetu v pooperačním období, resp. 7. den po operaci ve studii McConmara (158). Dalšími typy regulačních lymfocytů jsou pak CD8⁺Treg a Breg lymfocyty.

CD163 – hemoglobinový scavenger receptor zprostředkovává endocytózu komplexu hemoglobin-haptoglobin. Endocytovaný hemoglobin je zpracován hem oxygenázou na metabolity s inhibičním potenciálem (Hb-CD163-HO-1 \rightarrow ferritin-1). Váže i TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis), je i bakteriálním senzorem (159, 160). Pokud je stimulován, podporuje syntézu protizánětlivých cytokinů (161). Jeho exprese je zvýšena na monocytech a makrofázích u pacientů, kteří podstoupili kardiochirurgickou operaci. Kromě změn v expresi membránového receptoru, jsou změny i v dynamice solubilní formy, kdy měřené hodnoty také signifikantně rostou (162, 163). Dle studií jeho expresi zvyšuje stimulace receptoru TLR-2. CD163 má modulující účinky na imunitní systém. Vychytávání a odstraňování komplexu Hb/Hp chrání tkáň před poškozením volnými radikály, navíc vazba CD163/Hb:Hp spouští syntézu a uvolnění IL-10 (164–167).

Interleukin-4, ačkoli jej spíše spojujeme s hypersenzitivními reakcemi, má také inhibiční vlastnosti. Tlumí aktivitu a odpověď makrofágů, snižuje syntézu IL-1, TNF α , IL-6, IL-8 a ROS. Zvyšuje citlivost makrofágů na působení kortikoidů (167, 169). Tím vším se zapojuje do modulace imunitní odpovědi směrem k jejímu snížení.

Samozřejmě mechanismů a pochodů, které dokážou usměrňovat aktivitu imunitního systému je mnohem více, mohou to být i solubilní receptory, receptoroví antagonisté a patří sem i námi zkoumaná molekula CD200R, o níž bude psáno dále.

2.8 PARÉZA FUNKCE IMUNITNÍHO SYSTÉMU PO OPERACI, OVLIVNĚNÍ ZÁNĚTU

Peri- a pooperační aktivita imunitního systému má určitá specifika. Časná zánětlivá odpověď po zahájení operace je dána aktivací vrozené části imunitního systému ať již buněčné, nebo humorální, a tím i následné predominance subsetu Th1 a cytokiny produkované pod jejich „vládou“ IL-2, IL-12, INF- γ . Téměř okamžitě po zahájení operace se zvyšuje produkce IL-1, IL-6 a TNF α . Je zvýšená adheze neutrofilů a oxidační vzplanutí fagocytů. IL-8 a MCP-1 koreluje s operačním inzultem u pacientů s operací na srdci (170). Další reakce pak vedou k útlumu odpovědi – IL-6 zvyšuje i produkci PGE-2, IL-10, TGF- β . Je zvýšená produkce glukokortikoidů, katecholaminů, reaktantů akutní fáze např. IAP (immunosuppressive acidic protein), CRP. Zvyšuje se i koncentrace sTNFR, IL-1RA (171). Výsledkem těchto pochodů po počáteční hyperreaktivitě je pooperační deprese – paréza imunitního systému spojená s rizikem rozvoje infekčních komplikací – systémových i ranných (172, 173). Je prokázáno, že hladina IL-10 souvisí s rizikem rozvoje pooperační infekce – sepse (174). Koncentrace IL-10 spojená s operačním zákrokem více stoupá u klasických zákroků on-pump ve srovnání s mini CPB, kdy může být koncentrace až téměř 5krát nižší (175). Zvýšení hladin protizánětlivých cytokinů snižuje aktivitu leukocytů i jejich schopnost reagovat na stimulaci LPS produkcí TNF α .

Buněčná část imunitního systému je také ovlivněna operací. Již v průběhu operace se mění počty a zastoupení imunitních buněk. Jedním z faktorů poklesu počtů jednotlivých leukocytárních populací v krvi může být i zvýšená extravazace či krevní ztráty. Často totiž koreluje snižující se počet buněk s délkou operace a krevní ztrátou, která ji doprovází (176, 177). Je patrný peri- a pooperační pokles počtu lymfocytů celkově CD3⁺, hlavně pak T lymfocytů CD4⁺, CD8⁺. Dynamika poklesu CD4⁺ a CD8⁺ se liší. CD4⁺ klesají již v průběhu operačního zákroku, zatímco CD8⁺ v této době mírně stoupají a pak teprve klesají (178). Naopak se zvyšuje počet regulačních T lymfocytů a stejně tak procento HLA-DR⁺. U CD4⁺ lymfocytů jsou to pak více vyjádřeny Th1, jež jsou zatíženy pooperačním poklesem, ve prospěch subsetu Th2. Tento shift se projeví i v dynamice produkovaných cytokinů, kdy zprvu klesají koncentrace jak cytokinů asociovaných s Th1 (je snížena i intracelulární hladina INF- γ), tak i těch, jež jsou produkovány subsetem Th2 (intracelulární koncentrace IL-4 se pooperačně nemění). Rychleji se pak zotavují Th2 lymfocyty a převládají tak IL-4, IL-5, IL-13 aj. Tento stav je možná zvrátit podáním IL-12, který ruší pooperační supresi Th1, a tak

zvyšuje produkci $\text{INF-}\gamma$ (179). Krom snížení počtu vykazují lymfocyty nižší mitotickou aktivitu, sníženou sekreci cytokinů i proliferaci a zvýšeně podléhají apoptóze (180). Na inhibici lymfocytů se podílí i posttraumatické zvýšení exprese inhibičních receptorů a koreceptorů, z nichž můžeme jmenovat PD-1, CD47, CTLA-4, ale i snížení exprese koaktivačního receptoru CD28 (181). Z hlediska zkoumání zapojení signálních cest po stimulaci receptorů byla zaznamenána snížená fosforylace transdukčních kináz, Zap70, ERK 1, 2, Lck a p38, což vede k supresi až anergii lymfocytů. Pacientovy T lymfocyty jsou často neodpovídavé i na silnou stimulaci $\text{CD3}^+\text{CD28}^+$, což je nejspíše následkem zvýšené exprese inhibičních koreceptorů. CTLA-4 a $\text{TGF-}\beta$ navíc zvyšují expresi CD47, jehož stimulace trombospodinem aktivuje SHP-1 (182).

Dalším inhibičním prvkem je koreceptor PD-1, jehož aktivace také vede k aktivaci SHP-1 a defosforylaci Lck. Deaktivace Lck mobilizuje a aktivuje c-Cbl1 (ubiquitin-protein isopeptidase ligase c-Cbl), které „označí“ CD3 komplex a Zap70 pro následnou degradaci (181). Mění se i exprese CD97, která s pooperační dobou pomalu roste až do 3. dne a vydrží zvýšená do 7. dne (183). Nejvíce změn je pak v populaci T lymfocytů zachycováno 1. pooperační den a více bývají vyjádřeny u pacientů, jež podstoupili on-pump operaci srdce (183). Nejen T lymfocyty jsou zasaženy operačním výkonem, ale i další buňky – DC, NK, B lymfocyty. Mění se počty plazmocytoidních dendritických buněk, jež vzrůstají. Jsou to hlavně $\text{CD11c}^-\text{CD83}^+$ v kostní dřeni. K tomuto jevu byla vyjádřena myšlenka, že v těle probíhá subklinická virová infekce, která může mít za následek rozvoj SIRS (185). Dále klesá počet NK buněk a buněk nesoucích $\text{IL-2R}\gamma$ (186). Další zasaženou populací jsou i B lymfocyty. B lymfocyty jsou jednak stíženy početní ztrátou, a jednak také sníženou stimulací ze strany T lymfocytů. Vzhledem k tomu, že spíše převládá Th2 stimulace, je posun v imunoglobulinových třídách. IgE hladiny mají pooperačně zvyšující se trend, zatímco IgM a IgG vykazují pokles, s následnou úpravou (187).

2.9 OBECNÝ POPIS ZMĚN AKTIVITY A FUNKCÍ MONOCYTŮ A NEUTROFILŮ PŘI OPERAČNÍCH ZÁKROCÍCH

Na rozdíl od lymfocytární populace se počty leukocytů zvyšují. Může však být doprovázen útlumem jejich aktivity, což je dáno mikroprostředím, interagujícími buňkami, cytokiny, ROS aj. Může tak dojít ke snížení prezentace antigenů makrofágy. Je změněna exprese povrchových molekul, je nižší oxidační vzplanutí, aktivita i aktivace atd. (tab. 1).

2.9.1 Monocyty, uplatnění v reakci na operační zákrok

Operační zákrok zasahuje i populaci monocytů, kde může být situace „komplikována“ rozdílností subpopulací monocytů. Monocytární populaci je různorodá a obsahuje více subpopulací s odlišnostmi ve funkci např. dle exprese CD14 a CD16 na subpopulaci s nízkou prozánětlivou aktivitou $CD14^{hi}CD16^{-}$ exprimující IL-8, CCL2, CCL3 a vykazují protimikrobiální aktivitu a fagocytózu; $CD14^{hi}CD16^{+}$, jejichž zastoupení je mnohem nižší, jsou vysoce prozánětlivého charakteru a produkují $TNF\alpha$, IL- 1β a IL-6, pooperačně se jejich počty zvyšují, což jde ruku v ruce se zvýšením hladiny CRP. Subpopulace $CD14^{dim}CD16^{+}$ má pak vysokou afinitu k endotelu, proto je v krevním oběhu zastoupena minimálně. Po stimulaci neprodukuje kyslíkové radikály, má jen slabé fagocytární schopnosti, nízkou produkci myeloperoxidázy, lysozymu a v malém množství produkuje prozánětlivé cytokiny, konstitutivně exprimuje IL-1RA. Jsou označovány jako protizánětlivé. Tato populace se pak podílí na reparačních procesech v myokardu po ischemii, stimuluje fibroblasty a angiogenezi (188).

Obecně platí, že u monocytární populace se v průběhu kardiochirurgické operace setkáváme s narušením diferenciací $CD14^{+}$ monocytů, snížením exprese povrchových molekul HLA-DR a omezenou produkcí cytokinů např. $TNF\alpha$, IL-12. Syntéza IL-12 zůstává snížena i v případě, kdy je monocyt stimulován LPS v průběhu prvních pooperačních dnů. Produkce cytokinů se vrací k původní předoperační hladině cca 3. den, obnovení exprese HLA-DR potřebuje více času, i 10 dní. Pokles exprese může být až o 50 % (189, 190). Naopak se zvyšuje exprese CD62L i CD11b, tedy adhezních molekul potřebných pro přestup do tkání – diapedézu. Změny jsou i v expresi CCR2, která inverzně koreluje s hladinou MCP-

1, jenž stimuluje expresi CD11b/CD18 (191). Roste exprese CD64, stejně tak exprese scavenger receptoru CD163.

Vzrůstá i exprese TREM-1, což naznačuje zvýšenou prozánětlivou aktivitu monocytů. Aktivace TREM-1 s sebou přináší hlavně změny v oblasti syntézy cytokinů a chemokinů, která se zvyšuje, např. $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, M-CSF, IL-10, IL-8, MCP-1, MCP-3, MIP-1 α . Tento efekt je dále amplifikován stimulací TLR. Pokud jsou přidány protilátky proti TREM-1, zvýší se i v přítomnosti LPS nebo LTS produkce prozánětlivých cytokinů až 20krát. Největší nárůst exprese TREM-1 vykazují CD14^{hi}CD16⁺ monocyty (192). Bifázický charakter exprese vyazuje např. CD97 (7-TM /seven-span transmembrane receptor/ s ligandem CD55), kdy nejprve exprese klesá a následně stoupá nad počáteční hladinu (193). CD97 je adhezní molekula z rodiny GPCR (G-protein coupled receptors) exprimovaná myeloidními i lymfoidními buňkami, přičemž exprese roste po jejich aktivaci. Zapojuje se tedy do adheze, migrace a vytváření intercelulárních spojení. Je také molekulou proin vazivní, což je zvláště patrné např. u rakovinných buněk.

Dalšími molekulami, jejichž exprese je operací ovlivněná, jsou Toll like receptory – TLR-2 a TLR-4. Jejich exprese je stimulována vazbou ligandů na receptory, ale také cytokiny např. $\text{TNF}\alpha$, IL-6, Hsp70. Pooperačně dochází k přechodnému snížení exprese Toll like receptorů a ač je následováno jejich zvýšenou expresí, která může vysoce převyšovat předoperační hodnoty, nemusí být následována zvýšenou syntézou prozánětlivých cytokinů, jelikož jsou TLR méně odpovídavé na stimuly (194, 195). Snížení exprese TLR-2 může být dáno i internalizací tohoto receptoru v komplexu TLR-2/CD14 (196). U exprese TLR-4 je negativní regulace exprese dána i zvýšenou expresí molekuly SIGIRR (single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor /TIR/ domain) – je negativním regulátorem signalizace indukované IL-1 nebo LPS, patří do rodiny TLR/IL-1R (197). A nezvýšení produkce prozánětlivých cytokinů může být způsobeno aktivací drah vedoucích k syntéze IL-10. Na tomto má zásluhu aktivace signálních cest zahrnujících ERK, p38, MAPK, ale také PI3K/Akt, navíc i exprese miR-146b v monocytech snižuje syntézu prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-6, $\text{TNF}\alpha$, IL-8, CCL3, CCL2, CCL7 a CXCL10 (198, 199).

2.9.2 Neutrofilý, uplatnění v reakci na operační zákrok

Hlavní roli v zánětu hrají neutrofilý a jejich aktivace. Neutrofilý coby silné zbraně, které mohou způsobit i poškození tkáně, jsou tedy plně aktivovány nadvakrát. Tzv. resting neutrofilý, tedy v klidovém stavu, jsou nejprve vzbuzeny (primed), vystaveny určitému stimulu, až po dalším „zásahu“ dochází k jejich plné funkční aktivaci (200). Zánětlivá odpověď následující CABG (coronary artery bypass grafting) je provázena sníženou apoptózou neutrofilů a zvýšením respiračního vzplanutí. Zvýšený je také počet neutrofilů, zřejmě v důsledku jejich uvolnění z kostní dřeně, a hladina enzymů, které jsou jimi tvořeny, např. elastázy. Jejich zvýšení je spojeno s pooperačními komplikacemi, gelatináza je markerem renálního poškození, sérová myeloperoxidázy provází poškození plicního epitelu (201–205). Během operace dochází i ke zvýšení exprese adhezních molekul na endotelu i neutrofilech. Zvýšeně je exprimován integrinový komplex Mac-1 složený z CD11b a CD18. Větší intenzitu exprese vykazuje CD18. Řetězec CD11b nevykazuje výraznou změnu v expresi, záleží spíše na jeho adhezní kapacitě než na síle exprese jako takové. Ta je dána konformační změnou a odhalením neoepitopu s CBRM1/5, kterým se silně váže k povrchu endotelu. V průběhu operačního a pooperačního období roste počet CBRM1/5⁺ neutrofilů, a je obrazem funkčně aktivních neutrofilů.

Po podání heparinu dochází k snížení konformačních změn, a tím i odhalení CBRM1/5, zatímco CD11b a CD18 exprese se nemění. Vzhledem k tomu, že jsou to právě adhezní molekuly, které umožňují přestup neutrofilů z krevního oběhu do tkáně a tam podpořit zánětlivou odpověď, není překvapením, že pokud jsou podány protilátky proti CD11b/CD18, sníží se rozsah poškozené tkáně způsobené působením neutrofilů (206, 207). Zvýšeně exprimovány jsou i molekuly ICAM-1, VCAM-1 či PECAM-1 na povrchu endotelu. Toto zajistí pevnou vazbu mezi endotelem a neutrofilý. Jejich pohyb je zastaven a je zahájen proces transmigrace. Při přechodu do tkáně neutrofilý uvolňují svá granula (201).

Mezi další molekuly, jejichž exprese se mění v průběhu a v období po operaci, jsou CD64, CD43 a TREM-1, jehož aktivace je zodpovědná za neutrofilní degranulaci, respirační pochody v neutrofilech, ale také za stimulaci sekrece G-CSF a IL-8, navíc podporuje migraci neutrofilů do tkáně (208, 209). Stejně jako u monocytů, tak i u neutrofilů dochází ke změnám v expresi TLR. Exprese se snižuje s postupným návratem do preoperačních hodnot do cca 2. dne (202). Snižuje se také exprese CD16, což je receptor pro Fc IgG a zprostředkovává vazbu

a odstraňování imunitních komplexů. Aktivace CD16 je následována změnou do proadhezního fenotypu a zvýšené vazby na endotel. Snížení exprese či inaktivace receptoru CD16 vede ke snížené odpovídavosti na stimuly u neutrofilů (205, 210). Společně se změnami expresí molekul byl ovšem zaznamenán i pokles fagocytárních funkcí, jak ukázala studie s fagocytováním *Candida albicans* (211). Je také snížena schopnost respiračního vzplanutí po prvním „zásahu“, až druhý inzult vede k masivní aktivaci polymorfonukleárů, která může vyústit v orgánové poškození či dysfunkci. Sice je zvýšené množství i aktivita, ale neutrofily jsou méně odpovídavé. V případě infekce však může být aktivace neutrofilů obnovena stimulací membránové molekuly CD43 (202). Molekula CD43 (leukosialin) je integrální membránový protein typu I, podílí se na aktivaci a přežití buněk a regulaci adheze, a to díky své interakci s molekulami ICAM-1 a E-selektinu.

Tab. 1 Přehled změn na monocytech a neutrofilech souvisejících s operačním zákrokem

	snížení	zvýšení
Monocyty	<ul style="list-style-type: none"> - exprese povrchových molekul HLA-DR, CD71, CD14, CD80, CX3CR, v prvních hodinách - TLR-2, 4, CD15, CD45, CD11a, CD18, CD15 - produkce cytokinů – IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, TNFα, GM-CSF aj. - odpověď na stimulaci LPS, MPO 	<ul style="list-style-type: none"> - exprese povrchových molekul Fcγ-R1 (CD64), TNFR, p55, CD40; CD48; CD80, FcαR1 (CD89), TLR-4, TREM-1, IL-1Ra, - produkce cytokinů a faktorů – tkáňový faktor, MIF jako odpověď na stimulaci LPS
Neutrofily	<ul style="list-style-type: none"> - snížená exprese povrchových molekul TNFR, IL-1R, TLR-2, TLR-4, CXCR2 - apoptóza - odpověď na stimulaci LPS - fagocytóza, nitrobuněčná mikrobicidní aktivita - tvorba ROS, MPO 	<ul style="list-style-type: none"> - exprese povrchových molekul Fcγ-R1, fMLP-Rc, CD66b, IL-10R1 - exprese cytosolové fosfolipázy A2 a elastázy

3. Molekuly CD200R a CD200, charakteristika a funkce

Jedním z hlavních úkolů imunitního systému je chránit organismus nejen před nebezpečnými podněty zvenku, např. patogeny – viry, bakterie, parazité; environmentálními částicemi – alergeny, hapteny, ale i před poškozením, které může přinést jeho aktivace. Imunitní systém tedy musí mít mechanismy, které udrží rovnovážný stav – homeostázu. Pracuje jako dokonale sehraný orchestr v souladu s ostatními tělními tkáněmi a kompartmenty. Jak prospěšná může být pro organismus dobře cílená a správně namířená obranná reakce, tak ničivá může být dlouhá, nepřiměřená reakce, která bývá často zaměřena i proti vlastním strukturám. Je tedy více než důležité, aby existoval nejen aktivační prvek, ale také inhibiční. Právě inhibiční mechanismy se také staly oblastí zájmu mnoha vědců. Klinické využití těchto mechanismů je široké, zvláště pak u autoimunitních, prolongovaných zánětlivých infekčních i hypersenzitivních reakcí, ale mají své uplatnění i v oblasti transplantační medicíny, rejekce alotransplantátu, a onkologii. Jednou z membránových struktur, jejíž aktivace vede k indukci inhibice imunitní odpovědi, je CD200R a jeho ligand CD200.

3.1 HISTORIE, POPIS MOLEKULY CD200 A CD200R

CD200R a jeho ligand CD200 patří mezi membránové proteiny, které dokážou suprimovat reaktivitu imunitního systému, a chránit tak organismus proti možnému poškození. Tato molekula byla popsána roku 1982 profesorem A. N. Barclayem jako 41–47kDa membránový glykoprotein u myši označený jako OX-2 (212). K podrobnému osvětlení funkce tohoto membránového proteinu byly vytvořeny různé druhy protilátek blokujících, či potencujících aktivitu receptoru a vyšlechtěny speciální myší populace s fenotypem CD200^{-/-} za použití C57BL/6 embryonálních kmenových buněk, jejichž slezinné myeloidní buňky neexprimují CD200, zatímco exprese CD220, CD4, CD8 zůstává nezměněná (213). Ve slezině těchto myši dochází k zmnožení populací F4/80^{lo}-GR1^{hi}, F4/80^{hi}-GR1^{lo} v červené pulpě a jejich aktivaci (podobně v lymfatických uzlinách, zvláště mezenterických), také byly ve zvýšeném množství nalezeny MOMA-1⁺ (metallophylic

marginal-zone macrophages) a detekována vyšší aktivita ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) s transmembránovým adaptorovým proteinem DAP-10. I v CNS se našly změny, pokud zvíře vykazovalo fenotyp $CD200^{-/-}$. Mikroglie, které mají běžně genotyp $CD11b^{low}CD45^{low}$ u $CD200^{-/-}$ vykazovaly fenotyp $CD11b^{+}CD45^{+}$. Byly tedy aktivované (214, 215). Bylo popsáno, že při blokaci receptoru CD200R protilátkami proti němu namířenými, či u fenotypu $CD200^{-/-}$, je zvíře odpovídatější na vnější podněty. Snáze se u nich vyvolává odpověď pomocí antigenu MOG (myelin oligodendrocyte protein) za vzniku experimentální alergické encefalomyelitidy, období roztroušené mozkomíšní sklerózy, kdy dochází k výrazné migraci lymfocytů do CNS spojené se zvýšením hladiny prozánětlivých cytokinů, včetně zvýšené syntézy iNOS a produkce kyslíkových radikálů (216). Silnou prozánětlivou reakci lze navodit i chirurgicky, přetětím faciálního nervu, nebo imunizací pokusných zvířat kolagenem II s vyvoláním autoimunitní artritidy, či vyvoláním autoimunitní uveitidy (217–219). Gorczyński efekt molekul CD200/CD200R osvětlil na subpopulaci dendritických buněk NLDC145⁺, které jsou spojeny s lepším přežitím graftu u myši. Byla na nich objevena vyšší exprese OX2. Pro potvrzení myšlenky, že právě tento receptor je inhibiční a chrání graft, byl zablokován CD200R protilátkou mAbCD200. Došlo k reverzní reakci – odhojování štěpu a polarizaci cytokinového prostředí od Th2 k Th1, včetně aktivace CTL (220, 221).

3.2 CHARAKTERISTIKA A STRUKTURA POVRCHOVÝCH MOLEKUL CD200R A CD200

Molekula CD200 a její receptor CD200R jsou evolučně vysoce konzervované, neměnné, mezidruhově podobné, jak bylo prokázáno na zvířecích modelech. Lidská monoklonální CD200 Fc je schopná reagovat s myší CD200R, a naopak (222). Podobnost vykazují nejen ve své extracelulární části, ale i intracelulární, kdy dochází ke spouštění stejných signálních cest přinášejících stejný, v tomto případě inhibiční výsledek. Nejen mezi savci je patrná tato podobnost. Lze ji vysledovat i u virů kódujících tzv. vOX, který je z velké části homologický s CD200 molekulou (223, 224). Obě molekuly CD200 i CD200R je možné zařadit do skupiny imunoglobulinových transmembránových molekul, tj. obsahují typické Ig-like domény typu V i C.

Krom toho náleží k I-typu transmembránových proteinů, tj. jejich NH₂ terminální konec je směřován do extracelulárního prostoru, zatímco jejich COOH konec je situován

intracelulárně (obr. 7). Transmembránová hydrofobní část je polárně vázána k membránovým fosfolipidům (225). CD200R a CD200 mají velmi podobnou strukturu, liší se pouze svou cytoplazmatickou částí, která je u CD200 velmi krátká a nepřenáší žádné další aktivační nebo inhibiční signály. Jsou kódovány na stejném chromozómu, kterým je chromozóm 3, přesně 3q12-13 (226). Standardní CD200R1 cDNA kóduje 325 aminokyselin, 28 aminokyselin signálních sekvencí, 215 extracelulárních, 21 transmembránových a 61 cytoplazmatických, CD200 má přitom pouze 19 cytoplazmatických aminokyselin (obr. 7).

CD200 a CD200R jsou geneticky a strukturálně blízké kostimulačním molekulám CD80/86. Zatímco u myši se nacházejí mnohé izoformy tohoto genu označované jako mCD200RLa-e (CD200R-like), které jsou v interakci s membránovou molekulou DAP-12, jelikož ony samy mají kratší cytoplazmatickou doménu s lyzinovými zbytky, u lidí se nachází pouze jedna izoforma hCD200RLa/CD200R2, jejíž cytoplazmatický konec je taktéž zkrácen a je doloženo její funkční sdružení s DAP-12 (DNAX-activating protein-12). I gen pro tuto izoformu se nalézá na 3. chromozómu (227, 228).

Při zmapování exprese myších CDR00-like za použití RT-PCR se ukázalo, že CD200RLa se nachází hlavně na klidových mastocytech a také na dendritických buňkách kostní dřeně. Lb forma se preferenčně nachází na aktivovaných mastocytech. Vzhledem k faktu, že je tu více izoform se výzkumy začaly zabývat otázkou, zda je CD200 ligandem pro všechny formy CD200R. Gorczynského týmem bylo zveřejněno, že CD200 má afinitu k jakékoli formě receptoru CD200R, tedy i izoformám CD200RL (229). Tento závěr však byl negován výzkumem Deborah Hatherley (230). Poukazuje na to, že CD200 nemá velkou afinitu k CD200RLa, Lb, Lc, Le, a dodává vysvětlení, ve kterém hraje roli Gorczynskim opomenutá molekula DAP-12, s níž mají funkční spojení všechny CD200RL. A také strukturální odlišnosti v receptorech. Největší podobnost s CD200R na jejím vazebném konci vykazuje CD200RLe (91 % aminokyselin), nejméně pak CD200RLb (39 %) (231).

3.3 EXPRESE MOLEKUL CD200 A CD200R

Expres CD200 je rozšířenější než exprese receptoru CD200R. Mezi buňky, které nesou tuto molekulu, patří např. buňky hematopoetické – B lymfocyty, aktivované T lymfocyty, hlavně potom buňky myeloidní řady (monocyty, makrofágy, mastocyty, neutrofily, bazofily, eozinofily), ale také buňky mnoha dalších tkání – thymocyty, buňky

glomerulární, endoteliální, ovariální, trofoblastové, tonsil, neurony, kardiomyocyty, buňky močového měchýře, keratinocyty, retina a optický nerv (232–234). Exprese CD200 je konstitutivní, ale také inducibilní, pro bazální expresi je nutný C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein beta). Patří do skupiny transkripčních faktorů řídících diferenciaci buněk a terminální část zánětlivé reakce. Exprese je indukována např. TNF α , INF- γ , signály přes Toll like receptory, NOD2 aj. (235–237). Exprese CD200 se také zvyšuje u apoptotických dendritických buněk, díky p53, kde nastavují apoptotickou imunitní toleranci, neaktivují imunitní odpověď. Bylo zjištěno, že gen pro CD200 obsahuje p53Res (response elements), které aktivují p53 mediovanou genovou expresi. p53 je tedy dáván do souvislosti s apoptotickou imunotolerancí podporovanou CD200 (238).

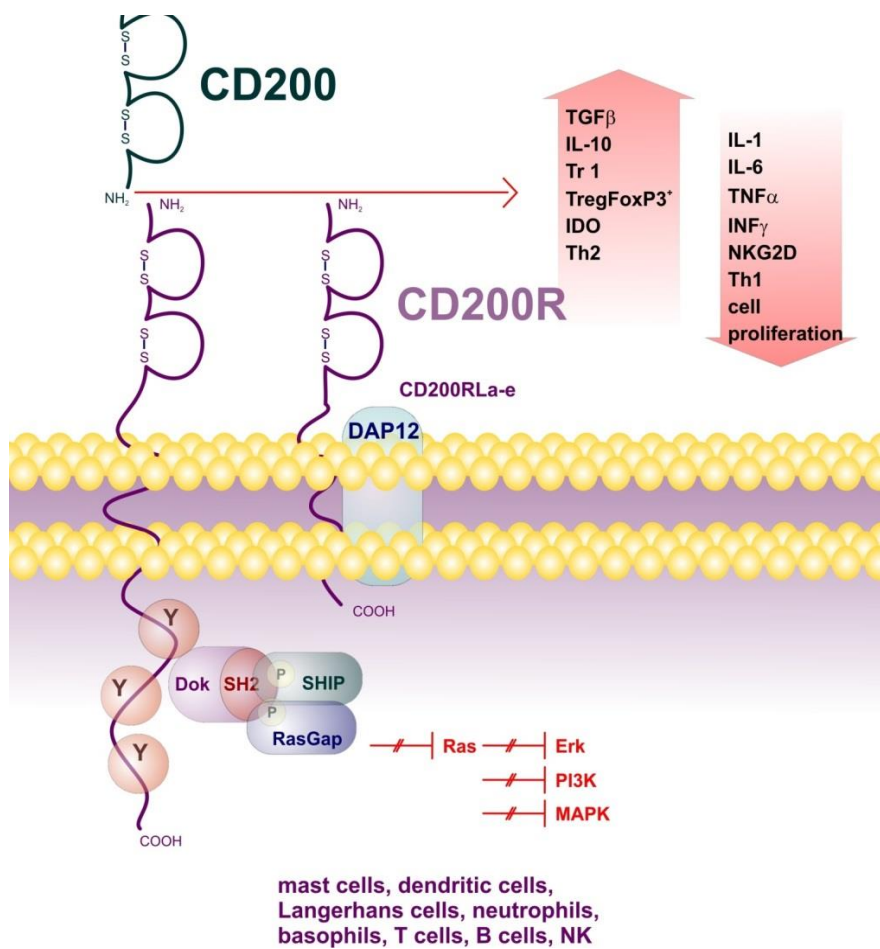
Exprese CD200R podléhá větší restrikci. Zahrnuje buňky myeloidní řady – bazofily, neutrofil, mastocyty, dendritické buňky, makrofágy – zvláště pak na subpopulaci M2a, kdy se dá přítomnosti CD200R na jejím povrchu použít jako marker právě pro tento subtyp (239). T lymfocyty také vykazují expresi CD200R (240). Dále je potvrzena exprese CD200R na B lymfocytech, NK, NKT, i když v menší míře. Intenzita exprese na jednotlivých buňkách lymfoidní řady se liší. Větší receptorová denzita je zachycena u paměťových, zralých buněk, CD4⁺ lymfocytech vykazují větší expresi CD200R, a to zvláště pokud jsou polarizovány do subsetu Th2 než třeba CD8⁺ lymfocytech. Přestože je CD200R na paměťových a plazmocycytech hustě vyjádřen, nedochází ani u knockout myši CD200^{-/-} k narušení humorální imunity, sekrece imunoglobulinů zůstává nezměněná (241). Intenzita inhibice imunitního systému koreluje s mírou exprese CD200/CD200R, tedy s denzitou vzájemných interakcí (242).

3.4 SIGNALIZAČNÍ KASKÁDASPOJENÁ S AKTIVACÍ CD200R

Jak již bylo zmíněno, CD200R patří mezi inhibiční receptory. Na rozdíl od většiny takových receptorů není jeho funkce spojena s motivem ITIM (immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif), který je typickým (nikoli jediným, jak vyplývá i z charakteristiky CD200R) znakem pro receptory tohoto druhu (243, 244). CD200R nese ve své cytoplazmatické části 3 tyrozinové zbytky, jejichž fosforylace je klíčová k aktivaci inhibiční signalizační cesty. Cytoplazmatická část obsahuje i motiv – sekvenci NpXY, jejíž součástí je jeden z tyrozinových zbytků CD200R (245). Tato doména váže konzervativní tyrozinový

fosforylační motiv PTB (phosphotyrosine binding domain) na dalších molekulách např. adaptorové Dok (down stream tyrosine kinase). Dle výzkumné skupiny kolem Zhanga je k aktivaci inhibice nejdůležitější třetí tyrozinový zbytek, jehož fosforylace je spojena s aktivací Dok2, zatímco druhý tyrozinový je pro signalizaci nepotřebný (246). Jiné výzkumy dokládají významnost všech tří zbytků (247). Shoda výzkumných týmů nastává v dalším průběhu signalizační kaskády, kdy pomocí Dok1, 2 je signál veden přes adaptorový protein Shc, který také obsahuje sekvenci PTB, stejně jako Dok, a je asociován s SHIP, což vede k aktivaci RasGAP komplexu, který účinně inhibuje další aktivační signály na RasMAPK, ERK (extracellular signal-regulated kinases), JNK (c-Jun N-terminal kinases), p38. Redukci aktivace MAPK (mitogen-activated protein kinase) u granulocytů se přičítá největší význam při inhibici degranulace mastocytů a syntéze jejich proteinů (248). Touto signalizační kaskádou je zajištěna inhibice buněk, na nichž se receptor nachází. Nejlépe je dokladováno působení na granulocyty, kdy dochází k zamezení degranulace a snížení syntézy prozánětlivých působků např. $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$, IL-1, NOS-2, IL-17, IL-6, IL-8, IP-10 (CXCL-10), MIG (CXCL9) (249, obr. 7; tab. 2).

Jedna z dalších prací nahlíží hlouběji do fungování Dok1 a Dok2 a přenosu signálu přes ně – od jejich fosforylace po další přenos signálu, kdy byl zjištěn rozdíl mezi vedením signálu u Dok1 a 2. Pokud jde přes CD200R indukovaná odpověď přes Dok1, je oddálená, Dok2 reaguje na podněty dříve a také je blíže „svázán“ s RasGAP a Nck proteinem (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1), patřícím do rodiny adaptorových proteinů, zatímco Dok1 s Crk a CrkL (adaptorový protein vážící tyrozin fosforylované proteiny, sám má domény SH2 a SH3, podobně jako Src (CT10 sarcoma oncogene cellular homologue). Pokud zablokujeme cestu CrkL nebo Dok1, zvýší se fosforylace Dok2, tím i aktivace RasGAP. C-terminální konec Dok1 a Dok2 obsahuje tyrozinové a prolinové sekvence. Ty mohou aktivovat domény SH2 a SH3 na proteinech např. Nck, což je protein s jednou SH2 doménou a třemi SH3, na něž se váží (250). Vzhledem k tomu, že se aktivace Crk, CrkL, Nck zapojuje i do cytoskeletálních změn, je s těmito změny spojena např. i fúze osteoklastů či migrace leukocytů (251; obr. 7).



Obr. 7 Struktura CD200 a CD200R receptoru, signalizační kaskáda a funkce

Vazba CD200 a CD200R je provázená aktivací nitrobuněčné signální kaskády rekrutující Dok 1 a 2, SH2, SHIP, RasGap. Díky tomu dochází k inhibici Ras, následně pak také Erk, PI3K, MAPK ve vyjmenovaných imunitních buňkách. Ovlivnění signálních drah vede k zvýšení či snížení exprese cytokinů, povrchových molekul, aktivity buněk atd. Znáznorněn je také fakt, že izoformy CD200R, s nimiž se setkáváme např. u myší, jsou funkčně svázány s DAP-12 (DNAX activation protein of 12kDa) (<http://actamedica.lfhk.cuni.cz/55/1/0012/>).

Tab. 2 Regulace imunologických dějů interakcí CD200/CD200R

CD200/CD200R	Zvýšení exprese	▲	Pokles exprese	▼
Cytokiny, chemokiny	IL-10, TGF- β , IL-4, IL-5		IL-1, IL-6, IL-2, INF- γ/α , IL-12	MIP-1 α , MCP-1, IL-8
Buňky a adhezní molekuly	Udržení buněk v nezralém či neaktivním stavu	Treg, Tr1, Tr3	Aktivita CTL Aktivace leukocytů, mikroglíí Migrace Antigenní prezentace	MHC I, II, ICAM-1/2, VCAM-1,2, VLA-4, LFA-1
Nemoci	Nádorová bujení – invazivita, metastazování	Imunotolerance Přijetí graftu Osteoblastogeneze	Autoimunitní choroby Neurodeg. choroby	Virové infekce Spontánní potraty Alergie
Enzymy, radikály	IDO		iNOS MMP-13 COX-2	Kyslíkové radikály (ROS) O ²⁻ , H ₂ O ₂ , OH ⁻

Jak již bylo zmíněno, interakce CD200 s CD200R a spuštění kaskády vedoucí k inhibici MAPK zasahuje do syntézy prozánětlivých cytokinů, ale je spojena i se snížením exprese adhezních molekul u epitelových buněk, čímž se omezí migrace a extravazace leukocytů (252). Ač vazba CD200 s CD200R inhibuje aktivaci buněčných elementů zavzatých do protiinfekční imunity, není organismus ohrožen. Pokud je receptor CD200R aktivován za přítomnosti LPS, CpG není jeho inhibiční odpověď vyjádřena, nebo ne v takové

míře. I přes jeho stimulaci, která vede i supresi, se rozvíjí účinná, dostatečně silná imunitní odpověď (253). Svou inhibiční funkci nevykazuje stimulovaný CD200R pouze v přímé inhibici aktivace granulocytů a jiných buněk, ale také v indukci diferenciaci T lymfocytů do regulačních buněk – Treg, Tr1 produkujících IL-10, TGF- β , podporuje přesmyk od Th1 k Th2 cytokinovému prostředí. Vazbou CD200 na CD200R se také aktivují IDO, která je zapojená do tryptofanového metabolismu, jehož konečným produktem jsou proapoptotické kynureniny. Použitím CD200Ig, která má vazbu na CD200R, lze také vyvolat expresi IDO a potencovat tak inhibiční mechanismy (254, 255; tab. 2).

3.5 RECEPTOR CD200R A JEHO LIGANDY

Mnohé další výzkumy se věnují co nejpodrobnějšímu zmapování úseků obou molekul – CD200/CD200R – a nalezení sekvencí, které zajišťují optimální interakci obou molekul vedoucí k inhibičnímu výsledku. Zmapování přesné struktury CD200 a CD200R potvrdilo, že se molekula obsahuje domény – CRD1, CRD2, CRD3 (cysteine-rich domains). Také bylo odhaleno a následně potvrzeno, že obě molekuly nejlépe interagují svými NH₂ terminálními extracelulárními konci a přesněji s úsekem β listu „GFCC“ vážícím ligandy. Syntetické peptidy extrahované z CD200 také vykazují protizánětlivé a supresivní účinky po navázání na CD200R. Nasyntetizované 15merní peptidy právě z těchto domén měly ověřit svou vazebnost k CD200R i účinky, které vazbou na receptor vyvolají. Krom funkce agonistické, inhibiční, také některé molekuly vykazaly antagonistickou povahu – zrušily předtím CD200 navozenou supresi např. u rejekce transplantátu. Tuto schopnost měly molekuly nasyntetizované z oblasti CRD1 a 3, zatímco protilátka z oblasti CRD2 fungovala jako agonista (256, 257).

Mimo jiné se podařilo objevit i expresi mRNA, která kóduje menší molekulu, v níž chybí exon 2. Tato molekula vzniká alternativním sestřihem RNA. Dalo by se předpokládat, že tato zkrácená molekula CD200–CD200tr (truncated) bude mít jiné biologické vlastnosti než dlouhá forma (full-length). A je tomu tak. Syntézu obou podob podporuje LPS, přičemž CD200tr zmenšuje tlumivý účinek navozený CD200. CD200tr se neváží na alternativní formy CD200R (258). Funkce CD200tr je kompetitivně antagonistická k CD200, ruší nastavenou imunosupresi (259). Poměr mezi expresí CD200 a CD200tr je regulován. Hladina CD200tr je determinována vazbou SF2/ASF na ESE (exonic splicing enhancer) druhého exonu, kdy

dochází k alternativnímu sestřihu. Zvýšená exprese SF2/ASF vede k syntéze dlouhého CD200, ale pouze v přítomnosti ESE. Je možné, že viry unikají imunitnímu systému nejen homologem CD200, ale také blokací syntézy CD200tr. Nedávné výzkumy vykazaly zvýšenou expresi SF2/SFA v mnoha tumorech např. plic, štítné žlázy, ledvin, střeva, melanomu. Dalo by se tedy říct, že při blokaci SF2/ASF by došlo i potlačení supresivních mechanismů navozených CD200, což by vedlo k účinnější léčbě (260, 261).

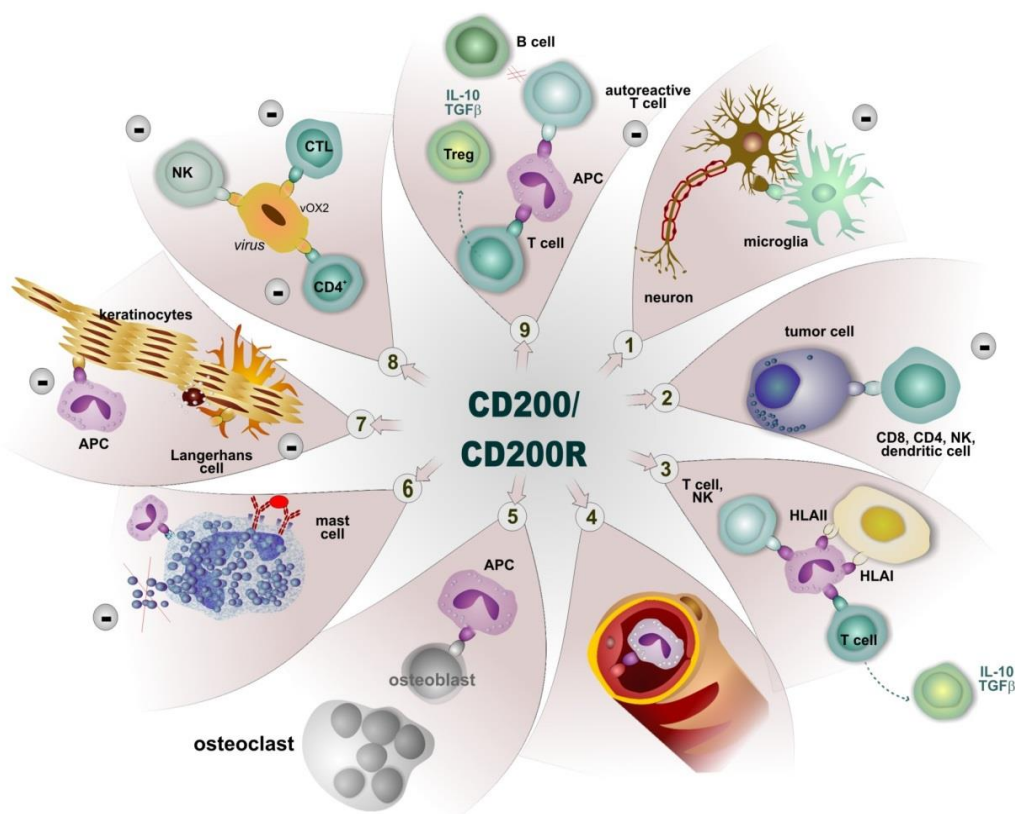
3.6 SOLUBILNÍ FORMA RECEPTORU CD200R, SCD200R

CD200R i jeho ligand můžeme najít i v solubilní podobě, tedy membránově nevázané. Solubilní proteiny mohou mít jinou funkci než jejich membránově vázaná podoba. Vazba solubilního CD200R na membránovou CD200 vede k blokaci možnosti navázání ligandu na v membráně ukotvený receptor, čímž by se spustila inhibiční signální dráha. Stejně tak může sCD200R vyvazovat sCD200 a zabráňovat jejich vazbě. Geny pro CD200R se nachází na chromozómu 3 v pozici 3q12–13. sCD200R vzniká na základě alternativního sestřihu mRNA, kdy dochází k předčasnému nastavení stop kodonu a není syntetizovaná intramembránová část. Krom tohoto mechanismu je patrně i CD200R, stejně jako CD200, odštěpován přímo z membrány. To by vysvětlilo okamžitý nárůst koncentrace sCD200R po operačním zákroku či při dlouhodobém upoutání na lůžko, resp. nehybnosti.

Tento efekt byl zkoumán při vystavení dobrovolníků podmínkám připomínajícím stav mikrogravitace. V tomto stavu dochází k osteoklastogenezi. U dobrovolníků pak stoupla i koncentrace sCD200R, přičemž interakce CD200R–CD200 podporuje osteoblastogenezi. Hladina sCD200R tedy odráží stav, kdy je odbourávána kostní tkáň (262). U CD200 je zaznamenáno, že za odštěpení je zodpovědná ADAM28. Je tedy pravděpodobné, že za odštěpením CD200R by také mohly stát metaloproteinázy, jejichž aktivita se zvyšuje v zánětlivém prostředí. Tento jev však není zatím popsán (226, 263).

3.7 KLINICKÉ ASPEKTY SPOJENÉ S INTERAKCÍ CD200R A CD200

CD200 a její receptor jsou molekuly, jejichž přínos v klinickém využití je velmi široký a významný. Jejich využití se zkoumá v oborech, jako jsou transplantační medicína, kde mají roli protektivní, onkologie, kde je jejich tlumivá funkce nežádoucí, neboť omezuje aktivitu protinádorové imunitní odpovědi, v imunologii, zvláště pak patogenezi autoimunitních onemocnění a alergií, kde tlumivé schopnosti těchto molekul mohou pomoci omezit nepřiměřenou reaktivitu imunitního systému. V neurologii se ukázalo, že sehrávají pozitivní roli ve vzniku a progresi takových nemocí, jako jsou Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc, ale také v úrazových stavech s poškozením mozkové tkáně. Dalším oborem, který by mohl zůžitkovat působení těchto molekul osteologie, neboť CD200R/CD200 vazba brání fúzi makrofágů za vzniku osteoklastů, či v dermatologii, kde může pomoc řešit problémy s alopecií (264–270; obr. 8).



Obr. 8 Zapojení signalizace CD200/CD200R do fyziologie a patofyziologie

1) nervová soustava, 2) nádory, 3) transplantace, 4) kardiovaskulární systém, 5) kostní tkáň, 6) alergie, 7) pokožka, 8) infekční nemoci, 9) autoimunita
(<https://actamedica.lfhk.cuni.cz/55/2/0059/>)

3.7.1 Kostí, metabolismus kostí, osteoklastogeneze vs. osteoblastogeneze

Metabolismus kostí, jejich tvorba a odbourávání, jsou složité procesy, které musí být udrženy v rovnováze. Na jedné straně je nutné tkáň resorbovat, na druhé tvořit novou. Do těchto procesů zasahují také molekuly CD200R a CD200. CD200 je exprimovaná na osteoblastech (původem mezenchymální buňky), zatímco CD200R na osteoklastech (myeloidní buňky). Na resorpci a remodelaci kostní tkáně se podílejí osteoklasty, které vznikají fúzí makrofágů na kostním povrchu (271). Při jejich nadměrné tvorbě a aktivaci může dojít ke stavům, kdy převáží ztráta kostní tkáně nad tvorbou, tj. k osteopatiím, osteoporóze, které jsou provázané vyšším rizikem vzniku špatně se hojících fraktur. Fúze makrofágů je regulovaná aktivací receptoru MFR/SIR α jeho ligandem CD47, na jejím průběhu se ovšem podílejí i další vlivy, k nimž patří i vazba CD200 s CD200R, přičemž exprese této molekuly se *de novo* objevuje na počátku fúze. Osteoklasty CD200^{-/-} se diferencují méně, je přítomná defektní multinukleace a narušena signalizace RANK (receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$)/RANKL \rightarrow MAPK, na jejímž konci je aktivace NF- $\kappa\beta$, která je nezbytná k osteoklastogenezi. Se snížením množství osteoklastů dochází ke zvýšení tvorby kostní tkáně, nárůstu kostní hustoty (272). Zvýšená exprese CD200 na osteoblastech či použití CD200Fc, je spojeno se zvýšením poměru OPG (osteroprotegerin):RANKL a tvorbou kostních nodulů (273). Do tvorby kostí mohou zasáhnout také kmenové buňky, které na svém povrchu nesou CD200, jenž se váže na CD200R osteoklastů a suprimuje tvorbu osteoklastů (274).

3.7.2 Nádory, pronádorová aktivita a role CD200R v patogenezi a progresi nádorového bujení

Incidence nádorových onemocnění vzrůstá. Je tedy velmi perspektivní zkoumat mechanismy imunitního systému, jakými nádorovou masu kontroluje, eliminuje, popřípadě, jaké mechanismy používá maligně transformovaná buňka, aby unikla imunologickému dozoru, a hledat nové léčebné metody. Podstatnou roli v protinádorové imunitě hraje její buněčná složka – NK, T lymfocyty CD4⁺ a CD8⁺, M1 – TAMS (tumor infiltrating macrophage), dendritické buňky, cytokinová komponenta např. IFN- γ , důležité jsou také

chemotaktické molekuly a receptory je vážící MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), MCP-2, MCP-3, CCR2 aj. (275). Na druhé straně jsou faktory, které umožňují růst a šíření nádoru, je to např. aktivita Th2, Treg, NKT typ 2, MDSC (myeloid derived suppressor cell). Z humorálních produktů jsou to potom IL-10, TGF- β , VEGF, inhibiční povrchové molekuly CTLA-4 i CD200 aj. Jednotlivé výzkumy dokládají, že buňky TIL (tumor infiltrating lymphocyte) ztrácejí v prostředí tumoru svou imunogenitu a snižují aktivitu, a to hlavně v důsledku zvýšené exprese CD200 maligními buňkami, a to i v případě metastazujících rakovinných buněk. Vazba CD200 s CD200R na buňkách imunitního systému vede k útlumu protinádorové odpovědi (276).

Se zvýšením exprese CD200 se setkáváme na solidních nádorech (např. na renálním karcinomu, nádorech hlavy a krku, testikulárních a ovariálních nádorech, mezoteliomech, melanomech, glioblastomech i nádorech tlustého střeva) i u hematologických malignit, kdy je CD200 výrazně vyjádřena na maligních buňkách – např. u CLL (chronic lymphocytic leukemia) či u lymfomů (277–279). Exprese CD200 je prokázána u 78 % případů CLL (280). Přítomnost CD200 je pak více akcentovaná u méně diferencovaných maligních buněk, přičemž tumory nejsou homogenní tkáně, jsou složeny z maligně změněných buněk v různém stadiu diferenciace. Lze mezi nimi najít i CSC (cancer stem cells), označované za iniciátory tumorogeneze. Mají velký proliferační potenciál, schopnost „samoopravy“, diferenciace a jsou nejvýraznějšími nositelkami znaku CD200. Tyto buňky jsou odolné i proti konvenční protinádorové chemoterapii, a tím jsou také odpovědné za následné relapsy i metastazování po ukončení léčby (281). Molekula CD200 je prediktor průběhu nemoci a její prognózy. Je tu negativní korelace mezi expresí a prognózou, která se snižuje s expresí CD200, což je potvrzeno hlavně u hematologických malignit např. myelomu (282, 283).

Využití znaku CD200 jako prediktoru prognózy v onkologii tímto nekončí. Je ho také možné použít jako diferenciálně diagnostické kritérium. Např. u rozlišení CLL vs. B lymfoblastické leukémie, kdy je to právě CLL, jejíž buňky exprimují CD200 (284). Případy týkající se hematologických malignit jsou nejlépe zmapovány. Zde je i největší těžiště výzkumů týkající se výroby účinné léčby s využitím antiCD200Ig, které by zabránily vazbě CD200 s jeho receptorem na buňkách imunitního systému. Jako perspektivní se u léčby CLL či lymfomů jeví také přidání látky snižující expresi CD200, což je např. PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (285). Jak již bylo zmíněno, ani solidní tumory nejsou zcela opomíjeny, co se týká zájmu o CD200 znak.

Nejčastěji je zmiňován melanom, jehož buňky vykazují výraznou expresi CD200, zvýšená exprese je potom zaznamenávána hlavně v melanocytických lézích a zvyšuje se závažností nemoci – exprese CD200 névus < melanom. Melanom je nádor s vysokou metastatickou aktivitou, jehož proliferační aktivita je potencována intracelulárními signálními cestami RAF/MEK/ERK/MAPK, kterými dochází k aktivaci mnoha genů zajišťujících proliferaci, ale i mobilitu, invazivitu, tedy metastazování. Cestou přes ERK je stimulována i exprese mRNA pro CD200. Dle výzkumů se zdá, že aktivace exprese CD200 touto cestou je typická právě pro buňky melanomu (286). CD200 exprese je pak také spojená s horší prognózou a rychlejší progresí. U CD200^{-/-} myši není růst a metastazování tak masivní jako u CD200^{+/+} myši (287).

U karcinomu prsu koreluje exprese CD200 s viabilitou, rezistencí nádorových buněk na terapii a metastazování do lymfatických uzlin. Z membrán nádorových buněk se odštěpením metaloproteinázou uvolňují molekuly sCD200, které pomáhají dotvářet tlumivé mikroprostředí tumoru. Metastazování do lymfatických uzlin u karcinomu prsu je facilitováno expresí CD200 (288, 289). S podobným stavem se potýkají i pacienti s hepatocelulárním karcinomem. CD200R i CD200 jsou hojně exprimovány v peritumorálním stromatu. CD200 navíc i v intratumorálně. Délka bezpříznakového přežití a celkové přežití pacientů koreluje s intenzitou exprese CD200R, s ní korelují i hladiny α -fetoproteinu. Autoři poukazují na možnost využít CD200R jako prognostického markeru (290). Vzhledem k tomu, jakou roli v patogenezi a progresi nádorů hrají CD200 a CD200R, jsou právě tyto molekuly cílem protirakovinné terapie. Je snaha vyrobit a do klinické praxe uvést protilátky proti CD200. Díky nim by se zamezilo inhibici TIL a nádorové buňky by byly pod kontrolou imunitního systému (291–293).

3.7.3 Viry a jejich homolog CD200, únik virů před imunitním systémem

Mnoho různých virů kóduje CD200 podobné proteiny vOX2. Podobnost s CD200 je u jednotlivých virů rozdílná. Jsou to např. herpetické viry (HSV, CMV), myxoma virus, virus spalniček atd. Nejčastěji jsou to ty druhy, které mají schopnost perzistovat v lidském organismu. Patrně nejvíce je v tomto ohledu prozkoumán lidský herpetický virus HSV-8, který je lymfotropní a kóduje také vOX2, jež jsou exprimovány na površích nakažených buněk monocyto-makrofágů. V tomto případě je ovšem na počátku infekce exprese této

molekuly spíše aktivační a v bazálních podmínkách nakažené buňky exprimující vOX2 produkují prozánětlivé cytokiny a mají vyšší fagocytární aktivitu. Po aktivaci vlivem INF- γ , však u těchto vOX2 exprimujících buněk dochází ke snížení produkce cytokinů, antigenní prezentace i fagocytózy. Pokud jsou makrofágy exprimující vOX2 kultivovány v přítomnosti jiných buněk s vOX2, stimuluje je to k vyšší aktivitě. Exprese vOX2 na B lymfocytech nakažených HSV-8 stimuluje monocyty k produkci IL-1 β , IL-6, MCP1 a jiných prozánětlivých cytokinů, což ovšem může posílit i proliferaci nakažených buněk. Přestože má vOX2 HSV-8 nevelkou podobnost (cca 20–40 %) s CD200, může se vázat na CD200R a spustit inhibiční signalizační kaskádu u buněk exprimujících CD200R, což jsou hlavně buňky myeloidní řady, včetně bazofilů (294–296). Také NK buňky exprimující CD200R mohou být virovým homologem CD200 negativně ovlivněny, což se projeví snížením cytolytické aktivity a snížením destrukce nakažených buněk (297).

Podobně jako HSV-8 kóduje i myxoma virus CD200 podobnou molekulu (M141R). Bylo zjištěno, že M141R nealteruje aktivaci a vstup makrofágů do místa infekce a drénujících lymfatických uzlin, co však inhibuje je jejich následná reakce, zvláště pak schopnost syntézy iNOS, také se podílí na snížení aktivace T lymfocytů, a to jak v uzlinách, tak i v periférii, což sníží i produkci INF- γ a následně i aktivaci subpopulace CD8⁺ a antigen prezentujících buněk. Tyto buňky pak exprimují nedostatek kostimulačních molekul. T lymfocyty nedostávají druhý signál a jsou anergizovány (298).

K bližšímu zmapování funkce vOX2, byla vytvořena protilátka vOX2:Fc. Tato má schopnosti suprimovat funkci neutrofilů, oxidační vzplanutí, inhibovat produkci IL-8 a MIP-1, ale netlumí buňky zcela. Na některé podněty mohou buňky nadále reagovat, např. si zachovávají schopnost fagocytózy v případě *E. coli* (299). Funkce vOX2 tedy není zcela jednoznačná, ale její inhibiční vlivy převažují. Toto se může jevit jako negativum ve chvíli, kdy musí organismus čelit virové infekci a bránit se jí. Mnohdy ale virová infekce vyvolá nadměrnou aktivaci imunitního systému, která může vést k poškození tkání. Je zdokumentováno, že dendritické buňky infiltrující plicní tkáň během infekce virem influenzy, exprimují ve vyšší míře CD200R. Setkání s ligandem jejich reaktivitu snižuje, jakož i celou další dynamiku probíhajícího zánětu, což je obzvláště v oblasti plic žádoucí. Bylo prokázáno, že omezení exprese CD200 je spojeno s vážným poškozením parenchymu v důsledku přehnané zánětlivé reakce i po podání subklinické dávky viru influenzy myším (300). Dalším příkladem pak může být zánět očí vyvolaný virem HSV, podání CD200Fc zmenší rozsah léze díky redukci buněčného infiltrátu v postižené tkáni (301).

3.7.4 Plíce, role CD200 a CD200R signalizace v patologiích plic

Plíce jsou orgánem, kde se setkávají imunokompetentní buňky s velkým množstvím antigenních podnětů, podobně jako v játrech. Není tedy žádoucí, aby na každý jeden byla vyvolána zánětlivá odpověď. Makrofágy v plicích (alveolární, intersticiální) mají spíše inhibiční, od antigenu očišťovací funkci nastavenou tak, aby nedošlo k rozvoji silné zánětlivé reakce. Odnímají antigen od DC, zabraňují jejich vyžrávání a migraci, ony samy pravděpodobně do uzlin nemigrují, produkují vyšší množství IL-10, stejně jako DC, pokud nejsou přes své TLR stimulovány LPS (302, 303). Plicní makrofágy také tlumí reaktivitu lymfocytů, mimo jiné i cytokinovým mikroprostředím. Distribuce makrofágů a jejich aktivita se liší u zdravých plic a u poraněných či patogeny infikovaných plic (304). Makrofágy v plicích mají vyšší expresi CD200, než je na makrofázích v jiných tělesných oddílech. Navíc i T lymfocyty vstupující do plicní tkáně vlivem chemotaxe stimulují zvyšování exprese CD200.

Na tlumivém mikroprostředí v plicích se podílejí také epiteliální buňky, neboť samy exprimují CD200, stejně jako i buňky typu II v alveolech. Při infekci influenzou dochází k zánětlivé reakci a souběžně s ní se zvyšuje exprese CD200, jako kontrolního a homeostatického prvku. U CD200^{-/-} pokusných myší došlo k neřízené zánětlivé odpovědi s vysokou buněčnou infiltrací plicního parenchymu, která vedla k vyčerpání, a až ke smrti zvířete. Zvýšeně se exprimovaly iNOS, IL-6, TNF α , MIP-1 α působící prozánětlivě, chemotakticky i destruktivně na plicní parenchym zvýšením oxidačního stresu a infiltrace buňkami imunitního systému (305). Pokud jsou podány agonisté CD200, sníží se peribronchiální infiltrace, zánětlivá reakce se dostává pod kontrolu, je tlumena a eliminována, včetně spouštěcího patogenu (304).

I další studie zaměřená na virus influenzy potvrzuje důležitost molekul CD200 a CD200R, při absenci CD200 dochází k vážnějšímu průběhu nemoci, prodloužení trvání, zvýšené prozánětlivé reaktivitě, což vše může vést k ohrožení postiženého. Zvyšuje se infiltrace plicní tkáně buňkami imunitního systému, T lymfocyty sice přispívají ke snížení virové zátěže, ale také zvyšují zánětlivou reakci se zvýšeným rizikem poškození jemného plicního parenchymu, což je spojené se snížením plicních funkcí (300, 306). V klinické studii s pacienty s CHOPN se ukázalo, že hladina sCD200 v séru pozitivně koreluje s IL-6 a

negativně s vitamínem D3. U myšího modelu CHOPN CD200^{-/-} je pak zvýšena koncentrace MMP-9, což dává tušit, že CD200 a CD200R se zapojují do patogeneze CHOPN (307).

3.7.5 Centrální nervová soustava, nemoci s ní spojené a role molekul CD200 a CD200R v patogenezi

Neurologie je také oborem, pro který jsou inhibiční vlastnosti molekuly CD200 a CD200R významné a mohly by být využitelné v léčbě mnoha chronických zánětlivých onemocnění, která destruuji nervovou tkáň, která nemá velký regenerační potenciál. Krom neuronů se v CNS nacházejí i gliové buňky zahrnující astrocyty, mikroglie, oligodendroglie. Právě glie mají stejný embryonální původ jako monocyto-makrofágové buňky. Tyto dvě řady si jsou antigenně i funkčně velmi podobné (308). Mikroglie hrají významnou roli v patologiích probíhajících v CNS, jsou hlavními rezidentními imunokompetentními buňkami. V CNS tvoří cca 20 % všech buněk. Je potvrzena jejich role v patogenezi neurodegenerativních a chronických zánětlivých onemocněních. Při aktivaci, stejně jako makrofágy, syntetizují a uvolňují velké spektrum imunomodulačních molekul – cytokiny, chemokiny, které jsou spíše prozánětlivé povahy např. dochází k uvolnění TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-1, MCP-1, MIP-1 α , fraktalkin (CX3CL1), včetně zvýšené exprese iNOS a vzniku kyslíkových radikálů, které vedou k poškození citlivých neuronů a jejich smrti (309). Ale současně exprimují např. i GLT-1 (glutamate transporter), která chrání CNS proti toxicitě glutamátu uvolněného ze synaptických spojení, a podílí se na antibakteriální ochraně např. proti *Toxoplasma gondii* (310, 311). Mikroglie fagocytují neuronální debris, amyloid- β , jenž je součástí plaků u Alzheimerovy nemoci, exprimují CD68 (znak lyzozomální aktivity), TLR, prezentují antigen atd. (312). Jejich aktivitu zvyšuje TNF α a již zmíněný amyloid- β . Vzhledem k bohaté celularitě CNS jsou buňky stále v přímém kontaktu. Mikroglie dokáže modulovat aktivitu okolních buněk, včetně neuronů. Pokud na svém povrchu exprimuje CD00R, které má navázán CD200 je v klidovém stavu.

Exprese CD200R na mikroglích a CD200 na neuronech se zvyšuje také traumatem a během ischemie při okluzi některé z mozkových tepen, kdy dochází k velmi strmému a difuznímu zvýšení exprese CD200 a CD200R, a to na kontralaterální straně od poškození, což je snaha zabránění rozšíření imunitní odpovědi i na zdravou tkáň (309). Naopak snížení

exprese je zaznamenávána u neurodegenerativních nemocí – Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, RSM aj. (313). U chronických procesů dochází ke snížení exprese CD200 bez změny v expresi CD200R. Snížení CD200 koreluje s dlouhodobou aktivací mikroglíí (314).

V pokusech se zvířaty IL-4^{-/-} se zjistil zásadní význam IL-4 ve stimulaci exprese CD200 po podání LPS (lipopolysacharidu). Deficit IL-4 v přítomnosti LPS je u těchto zvířat provázen výrazně zvýšenou tvorbou prozánětlivých cytokinů – TNF α , IL-1, IL-6 aj. v důsledku snížené exprese CD200 (315). Je totiž potvrzeno, že CD200R stimulace zvyšuje i expresi Foxp3 v mikroglíích, což samozřejmě zánět snižuje a nastavuje rovnováhu (316). Ovlivnění osy CD200 – CD200R se jeví jako vhodné také u neuropatických bolestí. Při výzkumu na laboratorních zvířatech, kterým byl poškozen sedací nerv, došlo po podávání fúzního proteinu CD200 ke snížení hypersenzitivity, a to jak na termické, tak mechanické podněty, spolu se snížením zánětu (314, 317).

3.7.5.1 Parkinsonova nemoc

V patogenezi této choroby hrají výraznou roli mikroglie. Je charakterizovaná zánikem dopaminergních buněk, což se projeví mnoha symptomy např. tremorem, bradykinezi, rigiditou atd. Dopaminergní neurony jsou velmi citlivé na oxidační stres. Roli v utlumení progresu nemoci hrají i CD200 a CD200R (318). V případě poškozeného neuronu by se měla exprese CD200R zvýšit, jak jsme toho svědky např. při ischemickém poškození mozku, k tomu ovšem u pacientů s Parkinsonskou nemocí nedochází. Odpovídavost buněk spojená se zvýšením exprese CD200 se snižuje s délkou chronického zánětu. Většinou není změněná bazální exprese CD200R, ale nedochází k potřebnému zvýšení. Podobně není zvýšená exprese obou inhibičních molekul ani při zvýšené hladině TNF α jako kompenzační inhibiční protizánětlivý prvek. Dysregulace ve funkci mikroglíí koreluje s věkem prvního nástupu nemoci. Pokud pacienti onemocněli v nižším věku, jejich mikroglie si zachovaly lepší odpovídavost na podněty expresí CD200 a CD200R (319).

3.7.5.2 Alzheimerova nemoc a jiné demence

Alzheimerova nemoc je druh demence charakterizovaný postupnou progresí a ztrátou mentálních schopností člověka a později i těch fyzických. Za jejím vznikem stojí ukládání proteinů typu amyloidů ve formě plaků v CNS, což je spojené také s tvorbou intracelulárních neurofibrilárních spleť, ztrátou neuronů, synaptické změny atd. V CNS je nastartován chronický zánětlivý proces podpořený také nárůstem produkce ROS. Amyloid- β aktivuje mikroglie např. kontaktem s jejich TLR-1, 4 (320, 321). U lidí trpících touto demencí je v oblasti hippocampu, horního frontálního gyru a dolního temporálního gyru signifikantně snížena exprese molekul CD200. Destruktivní zánět tedy není dostatečně tlumen.

Expresi molekuly CD200 mikroglie je možné posílit vystavením mikroglie interleukinům IL-4 a IL-13. V prostředí s vyšší koncentrací těchto interleukinů dochází k nárůstu exprese CD200mRNA. Při aktivaci mikroglie pomocí IL-4, IL-13 je totiž aktivován transkripční faktor STAT-6, jímž je indukována exprese mRNA CD200. U starších lidí se exprese však mRNA IL-4 v mozku snižuje, stejně tak mRNA CD200. Je zde tedy patrná souvislost mezi narušením exprese CD200 a progresí neurodegenerativních nemocí, které jsou spojené se ztrátou mentálních funkcí.

Posílení exprese DC200 a CD200R se ukazuje být protektivním prvkem omezujícím degenerativní procesy spojené s destrukcí buněk v CNS a této znalost by se mohla využít i v klinice (322).

3.7.6 Transplantační medicína, navození tolerance pomocí molekul CD200 a CD200R

Primární roli u transplantací hraje imunitní systém rozpoznávající „self“ a cizí. Je tedy nutné zajistit co největší shodu mezi příjemcem a dárce, tj. najít shodu mezi histokompatibilními komplexy HLA a MiHA (minor histocompatibility antigens). Aktivaci imunitního systému se nelze zcela vyhnout ani v případě vysoké shody mezi dárce a příjemcem. Vždy hrozí nebezpečí odmítnutí či postupné odhojení transplantátu na podkladě reakce imunitního systému. Na myším modelu bylo provedeno mnoho výzkumů zaměřených na nastolení tolerance vůči graftu. V reakci graft versus host se na snížení reaktivity graftu proti hostu podílejí jeho dendritické buňky exprimující $CD49b^+CD200R3^+$, tj. DCREg,

příčemž míra exprese CD200R3 je vysoká. Současně nesou tyto buňky na svém povrchu i vysoké množství MHC II molekul, ale jejich membrána je chudá na další kostimulační molekuly. Jsou tedy nositelkami antigenního signálu, ale neposkytují CD4⁺ další stimulační signály a anergizují tak efektorové buňky. DCreg také konvertují CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T lymfocyty na CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ iTregs, a to lépe než CD11c⁺ DC, které k tomu potřebují TGF-β. Tyto regulační buňky chrání hostitele i graft (323). I další výzkumy, které jsou prováděny na transgenních myších, potvrzují důležitost interakce CD200 s CD200R k udržení graftu. Jedná se např. o pokusy na myších, u nichž lze podáním doxycyklinu výrazně zvýšit expresi CD200, čímž dojde ke zvýšení úspěšnosti přijetí graftu (324). Tyto pokusy také potvrzují, že pro přijetí graftu je zapotřebí interakce CD200 s CD200R, která nastoluje toleranci imunitního systému k antigenům graftu.

Jeden z mnoha výzkumů se s výše zmíněnými transgenními myši prováděl s alografty kůže a srdce. Jako imunosupresivní léčba byl zvolen rapamycin. U myších heterozygotů první generace byla indukovaná exprese CD200 vodou s doxycyklinem, přesto došlo k odhojení graftu. Nestalo se tak u myších homozygotů, u nichž byla indukována vyšší exprese CD200 a k přijetí graftu stačila i nižší dávka rapamycinu.

Byla potvrzena přímá souvislost se zvýšenou expresí CD200 a přežitím graftu. Pokud je CD200 neutralizováno protilátkami, je výsledkem odhojení graftu. Pokud je již nastavena tolerance, není nutné další stimulační ke zvýšení exprese CD200, ovšem endogenní „přirozená“ exprese je nutná. CD200 se přímo podílí na inhibici buněk nesoucích CD200R, ale také nepřímo pomocí Treg lymfocytů, jejichž diferenciaci podporuje, změni se tedy cytokinové prostředí s posunem k protizánětlivému a tolerogennímu. To vše vede ke zlepšení přijetí transplantátu (325).

Jiné pokusy se soustřeďují na pretransplantační imunizaci myší dárcovskými DC přes portální žílu, která je spojena s nárůstem exprese CD200 na DC, negativní signál je tak „předán“ makrofágům. Infuzí monoklonálních protilátek antiCD200 se tento efekt anuluje (326). Jak již bylo v předchozím textu zmíněno, k supresi rejekce graftu dochází při interakci CD200 s CD200R také díky indukci polarizace T lymfocytů do subsetu Treg a zvýšení tvorby TGF-β. TGF-β je důležitým cytokinem k nastavení tolerance v organismu, potencuje diferenciaci populace T lymfocytů do CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ Treg, která ho poté samy dále syntetizují. Stejně jako DC produkující TGF-β mohou modulovat toleranci a posun k Treg Foxp3⁺, tak i tyto inhibiční lymfocyty mohou recipročně tlumit DC. V nedávné době byl výzkumnou skupinou Gorczynského vytvořen hybrid molekuly TGF-β s CD200Fc, tyto

k sobě byly vázány přes (Gly)₆. Otázkou bylo, zda a jak velkou inhibiční sílu bude tato hybridní molekula složená z dvou inhibičních komponentů mít. U pokusných zvířat se ukázalo, že ke stejnému účinku, jaký vykazuje TGF- β nebo CD200 samostatně, je potřeba dávky tohoto „hybridu“ v řádech desítek až stovek nižší (327). V pokusu se dále ukázalo, že účinek molekuly CD200Fc(Gly)₆TGF- β je možno neutralizovat podáním antiTGF- β tak i antiCD200mAb. Při zablokování receptoru pro TGF- β na splenocytech došlo ke snížení jejich schopnosti suprimovat a zhoršilo se přežití graftu. Výzkumná skupina došla k závěru, že CD200Fc(Gly)₆TGF- β je zapojena do nejméně dvou buněčných interakcí. Váže T lymfocyty přes TGF- β a antigen prezentující buňky přes CD200R1 (328). Navíc interakce mezi CD200 a CD200R pomáhá k diferenciaci tolerogenních dendritických buněk (329).

3.7.7 Kůže, homeostáza navozená pomocí CD200 a CD200R

CD200 a CD200R hrají podstatnou roli i v kožní imunitě, kde udržují, jako v jiných tkáních, homeostázu. Chrání před přehnanou imunitní odpovědí. Exprese CD200 v kůži je nejintenzivnější na Langerhansových buňkách (LC) a na CD3^{neg}MHC II^{neg} keratinocytech, které jsou ve vlasových folikulech, nejvíce pak v jejich vnější pochvě (330). A samozřejmě na myeloidních a lymfoidních buňkách, které se v podkoží nacházejí – mastocytech, makrofázích, $\gamma\delta^+$ T lymfocytech atd. Interakce CD200R s CD200 jsou nutné při nastavování tolerance, suprese kontaktní hapténové hypersenzitivity mediované UV zářením (fototerapií). Takovou toleranci nelze indukovat u CD200^{-/-} myši. CD200 exprimované na LC při interakci s CD200R pomáhá udržet LC v neaktivním stavu, neodpovídavé, nematurované. V tomto stavu jsou spíše tolerogenní než imunostimulační. A podobně jako DC i ony mají schopnost tlumit reakce proti vlastním antigenům, za nimiž stojí T lymfocyty. Právě LC jsou mediátory v UV indukované toleranci kůže. Společně s aktivací IDO po přímé interakci CD200 s CD200R je prostředí méně příhodné pro aktivaci auto-, alo-, haptén reaktivních T lymfocytů.

Dalšími důležitými buněčnými prvky jsou dendritické epidermální buňky, které mají fenotyp $\gamma\delta^+$ T lymfocyty a exprimují V γ 3-V δ 1 TCR i NKG2D, hrají roli v autoimunitních nemocech kůže, alergických kontaktních dermatitidách, kožních reakcích GvH, nádorech a stejně tak i v hojení poškozené tkáně (362, 331). Na svém povrchu nesou také CD200R a mohou tedy působit tlumivě (332). K ověřování funkce vazby CD200 a CD200R v kůži je využívána transplantace kožních štěpů. Po kožní transplantaci se při absenci CD200 rozvíjí

výrazná zánětlivá reakce. Prvními na poranění reagujícími buňkami jsou mastocyty, které uvolňují prozánětlivé cytokiny, ty mohou zahájit i zánětlivou reakci v graftu. Mastocyty běžně velmi silně exprimují CD200R, takže po kontaktu s CD200 dochází k utlumení těchto potenciálně ničivých reakcí. Pokud je ovšem u mastocytů fenotyp CD200^{-/-} objevují se autoimunitní nemoci a odhojování graftu.

V dermatologii se velký zájem obrací k vlasovému folikulu a k s ním spojené ztrátě vlasů. Vlasové váčky a struktury z nich vyrůstající zastávají mnoho funkcí – termoprotekce, ochrana kůže, taktilní vjemy atd. Při růstu vlasů prochází tento třemi fázemi – anagenní, katagenní, telogenní. V anagenním stadiu vykazují buňky nízkou expresi MHC I a anagenní vlasová cibulka exprimuje imunosupresivní cytokiny TGF- β atd., je v ní redukován množství antigen prezentujících buněk, které mají navíc málo vyjádřenou expresi MHC II, epitel vlasových folikulů exprimuje neklasické MHC I, které nastavují imunologickou toleranci. Folikuly v anagenní fázi produkují folikul asociované proteiny, které ale mají potenciál vyvolat autoimunitní reakci, což je mechanismus vzniku alopecia areata, lupus erythematosus aj. CD200⁺ keratinocyty a LC mohou chránit vlasový folikul a mírnit poškození vzniklé zánětem. Pokud dojde k deregulaci a depleci CD200, převáží zánětlivá odpověď, následuje zvýšená aktivace autoreaktivních klonů T lymfocytů nebo snížení počtu Treg. U alopecia areatae je signifikantně snížené zastoupení CD4⁺CD25⁺ T regulačních lymfocytů a snížená exprese CD200 (333, 334). V rámci snahy vyřešit alopecii se vědci dostávají k fenotypovému zmapování kmenových buněk vlasových folikulů, identifikaci jejich znaků, typicky jsou to K15, CD200, CD34, CD271, a přesnému určení jejich umístění a funkce (329, 335). U androgenní alopecie jsou KRT15^{hi} kmenové i progenitorové buňky CD200^{hi}ITGA6^{hi} a CD34^{hi} zastoupeny v nižším počtu. CD200^{hi}ITGA6^{hi} jsou multipotentní buňky, které mají regenerační a diferenciací schopnosti a dokážou vytvořit nový vlasový folikul. Za ztrátou vlasů tedy stojí hlavně úbytek CD200^{hi}ITGA6^{hi}. Úbytkem CD200^{hi}ITGA6^{hi} se také sníží aktivace kmenových buněk KRT15^{hi}, jejichž počet zůstává téměř nezměněn v porovnání skalpů s a bez vlasů (336, 337). Snížení exprese CD200 na kmenových buňkách vlasových folikulů je také spojená s předčasným šedivěním. Tyto kmenové buňky jsou totiž důležité pro udržení funkčnosti melanocytových kmenových buněk (338).

3.7.8 CD200R v patologii autoimunitních nemocí

Autoimunitní nemoci jsou spojené a narušením, resp. prolomením autotolerance a s vyšší aktivitou imunitního systému s tvorbou autoprotilátek. Pro představu, jakou roli hraje v patologii CD200R signalizace, jsme vybrali dvě autoimunitní nemoci.

Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida je autoimunitní systémové onemocnění. U predisponovaných jedinců (spojitost s HLA HLA DRB1*0404, DRB1*0401, DRB1*0101 aj.) se působením mechanických či jiných stresů (mikrobiální komponenta aktivující TLR na buňkách v kloubní dutině) poškodí synoviální tkáň, dojde k odhalení autoantigenů, jež jsou rozpoznány dendritickými buňkami, které migrují do lymfatických uzlin, kde je prezentují. U revmatoidní artritidy je synoviální membrána infiltrovaná T i B lymfocyty, dále jsou ve vysokém množství přítomné plazmatické buňky, které produkují autoprotilátky a RF – autoprotilátky zaměřené proti Fc fragmentům IgG, nejčastěji bývají ve třídě IgM a IgG – ty korelují lépe s tíží nemoci než IgM. IgA autoprotilátky se vyskytují u agresivních forem. Důležitá je i přítomnost mastocytů, aktivovaných makrofágů aj. Jimi produkované cytokiny, chemokiny, růstové faktory a další produkty imunitních i neimunitních buněk vytváří prozánětlivé prostředí vedoucí k destrukci chrupavčité, kostní i vazivové tkáně, ale také k neovaskularizaci (VEGF) a lymfangiogenezi. Jsou aktivovány fibroblasty, které v „rovnovážném stavu v kloubu“ působí protektivně, syntetizují kolagen a hyaluronan, i chondrocyty, osteoklasty a komplement reagující na imunoglobulin-antigenní komplexy (339, 340). Matrixové metaloproteinázy syntetizované aktivovanými fibroblasty degradující pojivovou tkáň a proteolytické enzymy produkované neutrofily narušují chrupavčitou tkáň. Z cytokinů hraje významnou roli TNF α , proto může být součástí terapie i využití antiTNF α . Dalšími významnými cytokiny jsou IL-1, IL-6 (možné využít léčivo tocilizumab, tj. humanizovaná protilátka proti receptoru pro IL-6), IL-23 aj. (341).

Vše výše napsané je spojeno s proliferací synovie a tvorbou zánětlivého panu v chronické fázi nemoci. Tento stav vede k celkové progresivní destrukci kloubů a postupné invalidizaci pacienta. Nemoc se neomezuje pouze na klouby, postižené mohou být i jiné tkáně

– pokožka s revmatoidními uzly, může se rozvinout amyloidóza, vaskulitidy, záněty serózní výstelky – perikard, pleura, plicní fibróza, anémie, oční potíže atd.

Vznik, dynamika a možnosti ovlivnění této nemoci je zkoumána *in vivo*. Jde o indukovanou artritidu u myši DBA/1. Ty jsou subkutánně imunizovány kolagenem typu II. U více než 50 % těchto myši se nejdéle do 30 dnů od imunizace rozvine artritida (342). Tyto pokusy se mimo jiné zaměřovaly i na zjištění významu a možnosti využití signalizace vazby CD200 s CD200R. U myši populace CD200^{-/-} je průběh onemocnění těžší a progresse rychlejší (343). Pokud jsou však myším aplikovány vytvořené CD200Fc (IgG2a), dochází ke zmírnění průběhu nemoci. Redukuje se exprese TNF α , IL-1 β , MMP-13, IFN- γ , IL-12, ale i mRNA pro IL-10. Při léčbě CD200Fc se nemění počet ani funkce T a B lymfocytů, nezvýšil se počet Foxp3⁺ a hladina protilátek proti kolagenu II IgG zůstala stejná jako u myši neléčených. CD200Fc, tedy nepůsobí přímo na T a B lymfocyty, ale působí prozánětlivě díky vlivu na myeloidní buňky. Pokud je podáno na CD200Fc před imunizací, nebo těsně po ní, je zvíře chráněno proti vzniku artritidy. CD200Fc tedy působí preventivně proti vzniku kolagenem indukované artritidy a výrazně snižuje zánět u již rozvinuté nemoci (344, 345).

Roztroušená skleróza mozkomíšní

Roztroušená skleróza mozkomíšní je chronické autoimunitní neurodegenerativní onemocnění charakterizované zánětem, demyelinizací a axonální degenerací při infiltraci nervové soustavy autoreaktivními klony T lymfocytů (Th1, Th17), autoreaktivními B lymfocytů, plazmatickými buňkami, monocyto-makrofágy, DC, jež také zajišťují prezentaci antigenů v sekundární lymfatické tkáni atd. (346). Přesná etiopatogeneze nemoci není známá. Spouštěčem může být virová či bakteriální infekce, důležitou roli hraje asociace s HLA haplotypy, např. HLA DRB1*15:01 a HLA-DQB1*06:02, svou roli sehrávají i epigenetické faktory se zvýšením koncentrace miRNA-155 aj. v lézích. Při „umělém“ vyvolání RS podobnému stavu u myši EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) podáním MOG (myelin oligodendrocyte glykoprotein) se zjistilo, že interakce mezi CD200 a CD200R hraje významnou roli v patogenezi této nemoci. Stejně jako u jiných neurologických zánětů dochází při aktivaci CD200 po vazbě s CD200 k inhibici aktivace mikroglií a snížení zánětlivé odpovědi. Expresce CD200 a CD200R se dá nalézt i v oblasti zánětlivých plaků, jejich exprese je ale při nemoci značně snižena (347, 348). Expresce CD200 je zaznamenána na neuronech,

axonech v bílé hmotě, astrocytech i oligodendrocytech, takže i tyto buňky mohou zasahovat do průběhu zánětu (349). Vzhledem k zjištěnému se zkoušejí možnosti použití agonistů CD200R, tj. CD200Fc, díky nimž by se zajistila suprese zánětu. Vytvořené CD200Fc byly podávány v chronické fázi vyvolaného autoimunitního zánětu (EAE/MOG) u myší. V této fázi onemocnění dochází po podání CD200Fc ke snížení závažnosti průběhu, snížení demyelinizace a axonálního poškození. CD200Fc také suprimují akumulaci makrofágů a mikroglií v CNS mechanismem snížení exprese integrinových adhezních molekul VLA-4 (very late antigen 4) a LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1), které jsou pro migraci do CNS přes hematoencefalickou bariéru nepostradatelné (350, 351).

CD200 také zvyšuje apoptózu CD11b⁺CD45⁺ a CD11b⁺CD45⁻ myeloidních buněk, ale ne astrocytů, jejich funkci pouze snižuje. Naopak u oligodendrocytů působí CD200 protektivně – protiapoptoticky, proti TNF α a INF- γ indukované apoptóze. Při současné přítomnosti IL-4 dochází k oslabení mikrogliální produkce TNF α a reverzní blokádě IGF-1 (insulin-like growth factor 1), jehož tvorba je indukována IFN- γ , to vše vede k oligodendrogenezi a remyelinizaci (352, 353). Z napsaného tedy vyplývá, že agonisté CD200R by mohly působit jako protektivní prvek snížením aktivace a supresí buněčných elementů, které podněcují zánětlivou reakci.

3.7.9 Cévní systém a role CD200 a CD200R

Cévní endotel má podstatný vliv na průběh imunitních odpovědí. Na svém povrchu exprimuje množství molekul, které napomáhají adhezi, rollingu a diapedeze imunitních buněk k místu poškození (ICAM-1, 2, VCAM, JAMs, PECAM-1, E, P, L selektinu) (354). Produkuje také množství různých cytokinů, chemokinů – IL-8 (CXCL8), GRO-1, 2, 3 (CXCL1, 2, 3), ENA-78 (CXCL5/epithelial-derived neutrophil attractant), GCP-2 (CXCL6/granulocyte chemotactic peptide), NAP-2 (CXCL7/neutrophil-activating peptide 2) aj. Produkce chemokinů v mikrovaskulárním řečišti je vyšší než v artériích, a jsou to právě malé cévy, v nichž dochází k největšímu kontaktu imunitních buněk endotelem a jejich přestupu do tkání (355). Pomocí imunohistochemických metod, flow cytometrie aj., byla zmapována exprese CD200 na endotelu. Nejvyšší se ukázala být právě v malých cévách, kapilárách. Zde tedy molekula exprimovaná na endotelu může inhibovat transmigraci imunitních buněk z krevního řečiště do místa poškození. Naopak velmi malé množství CD200

je exprimováno ve velkých cévách včetně aorty. Jsou patrné také orgánové rozdíly v expresi. Jaterní cévy exprimují CD200 málo, je zde již nastavena spíše tlumivá, tolerogenní reaktivita, plicní drobné cévy vykazují hustou expresi CD200. Není žádoucí, aby byla plicní tkáň zvýšeně infiltrována imunitními buňkami přestupujícími z krevního řečiště (356, 357). Je dokázáno, že i zde je vliv CD200 tlumivý, žádoucí a produkce TGF- β , již podporuje, napomáhá i „odstranění škod“ (358).

3.7.10 Zapojení signalizace CD200R do hypersenzitivních reakcí

Mastocyty cirkulují v oběhu jako nezralé buňky, maturují v tkáni, kam byly atrahovány. Jsou nejvíce kumulovány v perivaskulární oblasti, v blízkosti povrchů, které jsou ve styku s vnějším prostředím – kůže, dýchací cesty, GIT. Obracejí odpověď od Th1 k Th2. Syntetizují a skladují mnohé cytokiny a další bioaktivní látky. Jedná se např. o histamin, interleukiny IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 či IL-25, růstové faktory SCF (stem cell factor), GM-CSF (granulocyte monocyte-colony stimulatory factor), TGF- β , NGF (nerve growth factor), FGF-2 (fibroblast growth factor-2), VEGF, PDGF, prozánětlivé cyto- a chemokiny TNF α , MIP-1 α aj. Na svém povrchu exprimují receptory Fc ϵ RI, které mají vysokou afinitu k IgE, jejich exprese je regulována množstvím IgE, následně stačí i jen malé množství alergenů k vyvolání hypersenzitivní reakce, až anafylaxe (359, 360). Po vazbě a přemostění receptorů Fc ϵ RI totiž dojde k degranulaci mastocytů, bazofilů, a tím k okamžitému uvolnění histaminu, heparinu, proteináz a dalších preformovaných substancí. Navíc je zahájena *de novo* syntéza dalších substancí, a to např. leukotrienů a prostaglandinů a již výše zmíněných cytokinů. Mastocyty jsou také zavzaty do lokálního zánětu způsobeného alergenem, který, pokud perzistuje, vede také k nevratné remodelaci postižené tkáně. Produkované chemoatraktivní chemokiny potencují migraci eozinofilů, neutrofilů i monocytů do místa zánětu. Jejich produkce IL-4 a IL-13 vede k posílení aktivace Th2, která ve výsledku zvyšuje také hladinu alergen specifických IgE produkovaných B lymfocyty. Mastocyty a bazofily exprimují i CD40L, čímž vazbou na B lymfocytární receptory podporují produkci IgE přímo (361).

Jako všechny myeloidní buňky i mastocyty exprimují CD200R, který není jediným inhibičním receptorem na mastocytech. Dalšímu jsou např. Fc ϵ RIIB, gp49B1 aj. Inhibice

mastocytární degranulace je závislá na počtu aktivovaných vazeb CD200 s CD200R. Jedna ze studií ukázala, že fúzní proteinový agonista CD200R a solubilní CD200Ig dokážou inhibovat degranulaci mastocytů u pasivní kožní anafylaxe (PCA) navozené IgE (362). Z uvedeného tedy vyplývá, že FcεRI indukovaná degranulace může být inhibována pomocí vazby CD200 a CD200R, stejně jako i syntéza a sekrece cytokinů – TNFα, IL-13 aj. (363). Nesmíme opomenout ani to, že CD200R je exprimován také bazofily. Dle studií prováděných *in vivo* na myších se potvrdilo, že podávání antiCD200R3 protilátek vedlo k depleci cirkulujících bazofilů, což snižuje alergickou reaktivitu a riziko anafylaktické reakce (364).

4. CD95/Fas, charakteristika a funkce

CD95 a jeho ligand jsou proapoptotické molekuly patřící do rodiny TNFα – DR2. CD95, též známý pod názvy Fas či Apo-1, je polypeptid o 319 aminokyselinách. Je tvořen 3 extracelulárními doménami CRD které jsou bohaté na cystein (cystein rich domains; 157 aminokyselin). Další částí receptoru je transmembránová část (17 aminokyselin) a cytoplazmatický konec (145 aminokyselin) obsahující tzv. domény smrti. Extracelulární domény CRD2 a CRD3 tvoří vazebné místo pro ligand. Tyto se také podílejí na oligomerizaci ještě před navázáním ligandu, za vytvoření homotypických vazeb pomocí domény PLAD (pre-ligand assembly domain). Tato formace receptorů ale nemá žádné signální vlastnosti (365, 366). CD95 exprimují buňky imunitního systému, ale také tkáňové buňky – hepatocyty, buňky nervové soustavy, stejně tak jako nádorové. Na hepatocytech a nervové tkáni je exprese konstitutivní a podílí se na regeneraci tkáně (367, 368). Zatímco např. buňky imunitního systému setrvávající v klidovém stavu exprimují téměř zanedbatelné množství receptoru, jejich aktivace razantně a rychle zvýší expresi, neboť je již intracelulárně preformován, a tedy nemusí být nově syntetizován (369).

CD95 se vyskytuje ve více formách díky alternativnímu sestřihu primárního transkriptu. Můžeme se setkat s 5 volnými solubilními formami tohoto receptoru. Pojmenování vychází z toho, u kterého exonu proběhla delece: FasΔExo6, FasΔExo4; FasΔExo4,6; FasΔExo3,4; FasΔExo3,4,6 (370). Krom alternativního sestřihu se krátké formy vytváří též pomocí odštěpení z buněčné membrány. V tomto procesu se uplatňují např. metaloproteinázy, jmenovitě MMP-7 (371). Na rozdíl od membránové formy receptoru je

solubilním formám přisuzována spíše tlumivá funkce, neboť neutralizují vliv ligandů na vázané receptory, vyvazují je, taktéž se mohou vázat na membránové receptory CD95. Zvýšená exprese solubilních forem provází řadu nemocí: nehematologická nádorová onemocnění, lymfomy, srdeční selhávání, revmatoidní artritidu aj. (372, 373). Expresi CD95 ovlivňují mnohé faktory, jako jsou cytokinové prostředí, stimulace receptoru i např. virová onemocnění. Buňky infikované virem HVC, HIV-1 mají na svém povrchu více vyjádřen tento receptor (374, 375). Naproti tomu jsou i viry, které u nakažených buněk expresi CD95 snižují, jsou jimi myxoviry a adenoviry. Např. myxoviry mají vPLAD doménu, která interferuje s vazebnými místy na CD95 (376–380). Zcela logicky pak nacházíme snížení exprese CD95 na nádorových buňkách, které se tak chrání před indukcí apoptózy a smrti (379).

Na druhou stranu se ale ukazuje, že situace není tak černobílá, jak by se na první pohled mohlo zdát. Je možné, že CD95 může podporovat růst a metastazování tumorů. Jeho exprese na některých typech nádorů může být zvýšená, ale tyto receptory mohou být rezistentní na stimulaci, a tudíž nedochází k aktivaci apoptotických drah, naopak jsou aktivovány dráhy přes JNK, c-Jun, Erg1 a c-Fos, a vzhledem k tomu, že na nádorových buňkách bývá zvýšená exprese CD95L, mohou tyto buňky stimulovat samy sebe (380–382). Pronádorové působení pomocí stimulace CD95 je dáno aktivací kofilinu (je zapojen do konformačních změn aktinových monomerů a filament), a tím zvyšuje motilitu, a tedy i invazivitu nádorových buněk. CD95 patrně aktivuje kofilin hydrolýzou PIP_2 zprostředkovanou $\text{PLC-}\gamma$ (383). Je také zdokumentováno, že ligace receptoru podporuje i migraci myeloidních buněk skrz signalizaci cestou přes $\text{SFK-Syk-PI3K-Akt-MMP}$ do místa zánětu (384). Stimulace receptoru aktivuje i MAPK, p38, JNK a ERK i PI3K a v neposlední řadě $\text{NF}\kappa\text{-B}$ (385, 386). Také napomáhá TLR4/IRAK-4 uvolnění HMGB-1 z makrofágů. Uvolnění HMGB-1 při stimulaci CD95 je rychlejší než při stimulaci pomocí LPS (383). Se sníženou expresí CD95 je spojeno mnoho patologických stavů, je možné jmenovat autoimunitní pochody, kdy nedochází k regulaci homeostázy buněk imunitního systému, ať už se jedná o autoimunitní systémové, orgánově specifické, či lymfoproliferativní syndromy (388–390).

CD95 existuje v glykosylované (45–52 kDa) i neglykosylované formě (35 kDa) a je přítomen na membráně buněk v lipidových raftech i mimo ně. Nachází se volný, ale i v preasociované podobě (přibližně 110 a > 200 kDa). Enzymatickou N-deglykosylací je podpořeno vytváření agregátů. Je to tedy glykosylace, která zamezuje oligomerizaci receptorů/tvorbě jejich agregátů a jejich snazší a účinnější aktivaci vedoucí k široké škále

nitrobuněčných pochodů s výrazným dopadem na následnou reaktivitu imunitního systému (391, 392).

4.1 CHARAKTERISTIKA CD95 LIGANDU, VAZBY, EXPRESE

Stejně jako CD95 receptor se i jeho ligand vyskytuje v literatuře pod vícero názvy, jsou to např. APTL; FASL; CD178; CD95L; ALPS1B; CD95-L; TNFSF6; APT1LG1. Patří mezi II transmembránové receptory a čítá 281 aminokyselin. Z toho 1–81 aminokyselin tvoří intracelulární část a 82–102 aminokyselin tvoří transmembránovou část (393). Nachází se koncentrovaně v lipidových raftech, za což je pravděpodobně nejvíce odpovědná cytoplazmatická na prolin bohatá doména, PRD. Tímto uskupením je zvýšena apoptotická účinnost molekuly při vazbě na receptory (394, 395). Navíc mu PRD sekvence umožňuje vazbu s kinázami rodiny Src (Fyn, Lyn, Lck, Hck atd.), a tím reakci s PI3K, Akt, ERK, jež dále přes SH3 doménu aktivují transkripční faktory NFAT, AP-1, což vede k proliferaci aktivovaných buněk, INF- γ produkci atd. (396). Intracelulární část CD95L obsahuje serinové a treoninové zbytky, jež se váží s adaptorovými proteiny souvisejícími i s TCR signalizací u T lymfocytů, tj. s Grb2, Gads, p53, Nck, který odpovídá i za změny aktinového cytoskeletu, čímž se CD95L podílí na buněčné migraci; a s proteiny skupiny nexin 9, jež jsou spojené s endocytózou a endozomálním roztrháním aj. (397, 398).

Dalším konzervativním intracelulárním regionem na CD95L je kasein kinázový substrát/motiv, část fosforylující kasein kinázu. Signalizace přes tento úsek je spojena s reverzní signalizací (399). Krom zmíněných domén má CD95L také domény pro vazbu metaloproteináz. Z toho vyplývá různá možnost štěpení a vznik různých štěpných produktů membránového CD95L, které mají 26–29kDa (400). Solubilní CD95L mají i jiné než apoptotické vlastnosti, jejich působení může stát za rozvojem autoimunitních a nádorových pochodů (401). Co se vazby na receptory týká, krom CD95 se CD95L váže i na DcR3 (alternative decoy receptor 3) či TNFRSF6B (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy). Tato vazba inhibuje apoptotickou funkci CD95L a stojí za zvýšenou aktivitou nádorového bujení (402). CD95L u T lymfocytů také nefunguje pouze jako zprostředkovatel apoptotického signálu, ale funguje i jako kostimulační molekula, podporuje jejich proliferaci a jím zprostředkovaná reverzní transkripce je zapojena i do pozitivní selekce

buněk v thymu (403). Jak již bylo zmíněno, CD95L je jednak exprimovaný na membráně, ale je skladován i intracelulárně. Tuto možnost podporuje N-glykosylace, jelikož zabraňuje degradaci proteinů lysozomální membrány. Umístění do lysozomu je pak zprostředkováno vazbou domény PRD s SH3, kterým je kontrolováno i jeho uvolnění (404). Např. T lymfocyty a NK buňka skladují CD95L v sekrečních lysozomech, odkud může být na mnohé podněty sekretován (405).

CD95L je exprimován buňkami imunitního systému, a to cytotoxickými lymfocyty, NK buňkami, aktivovanými B lymfocyty aj. Jeho exprese na nich je zvýšena, pokud je aktivován i CD16 a v přítomnosti IL-2 a IL-12 (390, 406). CD95L je na rozdíl od ostatních buněk myeloidní linie konstitutivně exprimován neutrofily (407). U nich je možné, že tato exprese funguje jako samoregulační, spouštějící samovolnou/spontánní apoptózu. Dalšími zdroji CD95L jsou i nádorové buňky, buňky přední oční komory, hepatocyty, spermatozoa, buňky dělohy, endotelie, astrocyty, mikroglie aj. (408, 409). Byla mapována i přesná tkáňová exprese mRNA pro CD95L, exprese byla potvrzena v červené pulpě sleziny, zatímco bílá byla negativní na přítomnost CD95L mRNA. V thymu potom byla exprese nejvýraznější v oblasti hranice mezi kůrou a dřením, exprese v uzlinách byla omezena na oblast pod epitelem krypt, kde bylo exprimovány plazmatickými buňkami, převážně těmi, které současně produkovaly IgG a IgA. Vzhledem k tomu, že i trávicí trakt je bohatý na lymfatickou tkáň, provádělo se testování i u něj. Největší podíl exprese mRNA byl zachycen v plazmatických buňkách a dále pak mononukleárech (410). Již jsme zmínili, že stejně jako jeho receptor i CD95L je lokalizován presyntetizovaný uvnitř buňky (411). Expresi pak může zvýšit mnoho podnětů, mezi něž patří např. stresové situace, včetně tepelného šoku, chemické působky, radiace, uvolnění růstových faktorů či virová infekce (412). Exprese CD95L je regulována mnoha transkripčními faktory např. NFAT, NF- κ B, c-myc, IRF-1, Egr-3, přičemž Egr podporuje expresi CD95L i na dvojité negativních thymocytech (413).

4.2 FORMY CD95L – SOLUBILNÍ, MEMBRÁNOVĚ VÁZANÉ

CD95L existuje ve více formách. Jednak se vyskytuje membránově vázaný, a jednak solubilní. Solubilní formy vznikají proteolytickým štěpením, ale také alternativním sestřihem či posttranslační modifikací (414). Do procesu extracelulárního odštěpení jsou dle všeho zapojeny metaloproteinázy MPP-2, MMP-3, MPP-7, MPP-9 či inhibitory metaloproteináz

TIMP-1, TIMP-2 (415, 4162). Solubilita je zvýšena N-glykosylací, snáze se odštěpuje působením metaloproteináz z membrány (417). Např. u T lymfocytů se setkáváme s procesem tzv. retrográdní reverzní signalizace (418, 419). V tomto procesu jsou rozeznávány dva kroky, první štěpení je zajištěno ADAM10 (a disintegrin and metalloproteinases domain-containing protein 10) a vytváří N-terminální fragment, který neobsahuje doménu, jíž by se mohl vázat na receptor. Následuje intramembránové štěpení tentokrát pomocí SPPL2A (signal peptide peptidase-like 2a) a I-CLIP (intramembrane cleaving protease), která uvolní část odštěpené molekuly z membrány do intracelulárního prostoru. Tento cytoplazmatický konec může vstoupit do jádra a ovlivnit přepis genetické informace např. interaguje s Lef-1 (transcription factor lymphoid-enhancer binding factor-1) a reguluje transkripci na něm závislých genů. Tento proces zasahuje také do aktivací indukované proliferace T a B lymfocytů tím, že snižuje fosforylaci fosfolipázy C γ , protein kinázy C a ERK1/2 aj. (420–422).

CD95L se vyskytuje v podobě trimeru, nebo dokonce hexatrimeru, jak popsal Zhang, přičemž hexamerní podoba CD95L nespouští apoptotické procesy (423). Tvorba těchto polymerů je umožněna doménami SA (self assembly), váže se na CD95 a jeho vazba spouští apoptotickou kaskádu, ale nejen ji (424–427). Jelikož není vždy žádoucí spuštění apoptózy, hlavně pak v imunitně privilegovaných tkáních, je nutné expresi CD95L přísně regulovat. Jeho zvýšená exprese může vést k řadě imunopatologických stavů, exacerbacím autoimunitních pochodů, ale také nádorového bujení, kdy nádorové buňky exprimují ve velkém množství CD95L, čímž navozují apoptózu u buněk imunitního systému, které by je měly eliminovat. Exprese CD95L je také zvýšená u stavů, kdy dochází k rejekci štěpu aj. Regulace CD95L, v tomto případě snížení exprese či vyvážení solubilního ligandu, by mohla být využito v léčebných postupech, např. v případě pacientů se systémovým lupusem či u GvH nemoci (428–430).

4.3 SIGNALIZACE ZPROSTŘEDKOVANÁ VAZBOU MEZI CD95 A CD95L

CD95 se na buněčných membránách nachází jako monomer či v preasociované podobě, nezávisle na stimulaci ligandem. Distální cysteinové domény PLAD (preligand assembly domain) vytvoří komplex ještě před samotnou stimulací ligandem (431–433). V časně fázi je možné detekovat formování tzv. SPOTS (signaling protein oligomerization transduction structures), které vede k podpoře vytvoření větších a stabilnějších celků. Proces

správné lokalizace receptorů, jejich agregace do lipidových raftů a následná internalizace je přímo spjat s palmitoylací proximálního cysteinu v posttranslační fázi tvorby intracelulární části receptoru. Právě palmitoylace je signálem zajišťujícím lokalizaci receptoru do lipidových raftů/mikrodomén membrány. Redistribuce je důležitá pro úspěšné sestavení DISC a internalizaci (434–436).

V případě stimulace pak dochází k formaci stabilních agregátů, receptor trimerizuje, což je doprovázeno sestavením komplexu DISC. Další cesty se pak mohou ubírat dvěma směry. Jednou z nich je aktivace kaspázy 8 a druhá štěpení Bid s uvolněním cytochromu C doprovázené aktivací kaspázy 9. Receptor je stimulován CD95L, který se váže na 2. a 3. CRD. Je popisováno, že zatímco membránově vázaný CD95L spouští proapoptotické signální cesty, jeho solubilní forma může mít i opačný efekt (437). Aktivace receptoru ovšem nemusí skončit pouze spuštěním apoptotické kaskády, může být provázena i stimulací, podporou proliferace, migrace i regenerace buněk nesoucích receptor, což je zachyceno např. v případě lymfocytů, jaterních či nervových buněk (438, 439). Dle Leeovy studie je po vazbě CD95 a CD95L komplex internalizován do časného endozómu, což je zprostředkováno klatrinovou endocytózou, a dochází k sestavení DISC. Internalizace a umístění do endozómu jsou zásadní faktory pro zahájení sestavení DISC a apoptózy, pokud nedojde k internalizaci, nepřicházejí apoptotické signály, ale signály pro přežití buňky (440).

4.4 SESTAVENÍ KOMPLEXU DISC PO VAZBĚ CD95L A CD95

DISC (death-inducing signaling complex) je komplex, která má molekulovou hmotnost >700 kDa. Neplatí v něm, že jednotlivé komponenty, tj. receptor, FADD (Fas-associated protein with death domain) a kaspáza 8 jsou zastoupeny v poměrech 1:1:1. Poměr receptor a FADD je 3:1, na aktivaci FADD je tedy nutné více receptorů, prokaspázy 8 je pak až 9x více než FADD (441). Sestavení signalisomu DISC je nezbytnou podmínkou pro aktivaci apoptotické dráhy, ale také pro možné přežití buňky. Konformační změny molekul CD95 po jejich stimulaci či již při jejich polymerizaci vede k odhalení DD domény (death domain), na níž se váže adaptorová molekula FADD/MORT-1. To však pouze za předpokladu, že je vytvořen trimer z CD95, homotypická vazba skrz DD domény CD95 a FADD jej dále stabilizuje, jelikož vazby samy o sobě nejsou dostatečně silné a komplex může

být nestabilní (442). FADD obsahuje dvě domény smrti. Druhou je DED (death effector domain). Tato je odhalena po vazbě DD na CD95 DD. DED je schopná vazby s prokaspázou 8 a 10. Je však schopna vázat i cFLIP (FLICE-inhibitory protein). cFLIP se vyskytuje v několika isoformách – krátké cFLIP_S (26 kDa), cFLIP_R (24 kDa) a dlouhé cFLIP_L (55 kDa). Všechny tři zmíněné formy jsou schopné reagovat s FADD a mohou se zapojit do sestavení DISC (443). cFLIP_S působí antiapoptoticky stejně jako cFLIP_R. Jiná situace je u cFLIP_L, který má krom antiapoptotických vlastností také proapoptotické. cFLIP_L má ve své struktuře tandem DED domén, stejně jako cFLIC_S a cFLIC_R, a navíc neaktivní kaspáza-like domény p12 a p21. V přítomnosti cFLIP_L je prokaspáza 8 štěpena, a to v pozici Asp-376, čímž naplňuje své proapoptotické vlastnosti (444). To, jaký bude vliv cFLIP_L, je dáno několika faktory. Jedním je jeho koncentrace v DISC. Pokud je přítomen ve vysoké koncentraci má antiapoptotický vliv. Při silné stimulaci CD95 (tj. vyšší expresi CD95L) nebo v přítomnosti vysoké koncentrace cFLIP_S i cFLIP_R má proapoptotické účinky a zapojuje se do aktivace prokaspázy 8 v DISC. cFLIP je prokaspázou 8 štěpen na N-terminal FLIP (p43) a C-terminal FLIP (p12). Je to právě podjednotka p43, která může indukovat jinou cestu krom apoptotické, tedy aktivovat cesty vedoucí k indukci NF-κB. Tato podjednotka je v interakci se součástmi signální dráhy TNFR – NF-κB, do níž jsou zavzaty TRAF1 a TRAF2 (TNFR-associated factor 1, 2) a RIP (receptor-interacting protein kinases). Podjednotka p43 může také přímo aktivovat IKK komplex (445, 446).

Prokaspáza 8 je schopná vytvořit tři typy dimerů v DISC komplexu. Jednak je to homodimer ze dvou prokaspáz 8, a jednak heterodimery v kombinaci prokaspáza 8 a cFLIP_L či cFLIP_{S/R}. V případě, kdy se vytváří homodimer, je prokaspáza štěpena na podjednotky p43/p41 a p18. V případě heterodimeru prokaspáza 8/cFLIP_L vznikají p43/p41 a p43-FLIP. Vzniklé produkty hrají významnou roli v tom, jaký signál převáží po stimulaci CD95, zda proapoptotický nebo signál nutný pro přežití buňky ubírající se cestou NF-κB, MAPK (447; obr. 9).

4.5 DVA DRUHY BUNĚK DLE CHARAKTERU SESTAVOVÁNÍ DISC

V případě signalizace CD95 po vazbě CD95L rozeznáváme dva typy buněk. Typ I se vyznačuje velkým množstvím sestavených DISC, zatímco u buněk typu II je apoptotická cesta posílená zapojením mitochondriální cesty, v níž významnou roli sehrávají inhibitory Bcl-2, tedy antiapoptotické molekuly, a v opačném směru působící molekuly Bid (obr. 10).

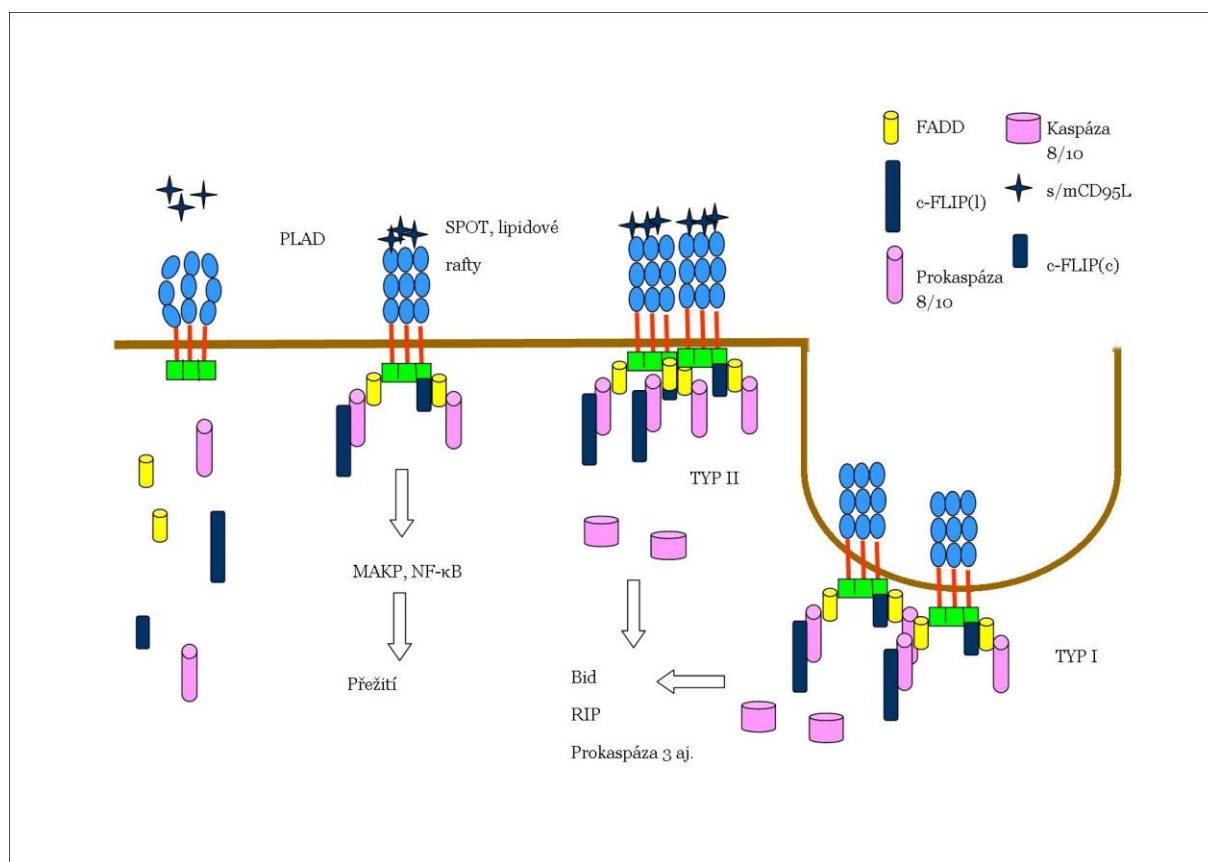
Typ I: sestavení velkého množství komplexů DISC po aktivaci receptoru CD95. Internalizace receptoru je rychlá, na rozdíl od buněk typu II, kde je odložená nebo k ní nemusí dojít vůbec.

Typ II: sestaví se malé množství DISC, reakci k apoptóze je nutné amplifikovat, dochází tedy k inaktivaci faktorů, které působí antiapoptoticky – Bcl-2. Štěpení Bid z rodiny Bcl-2 kaspázou 8 vede k vytvoření krátké formy tBid. Tato má vliv na uvolnění cytochromu c z mitochondrie, když se váže na cytosolový adaptorový protein Apaf1 (apoptotic protease activating factor 1). Tento děj vede k podpoře formace apoptozómu a aktivace prokaspázy 9.

Krom „klasického“ DISC může dojít u obou typů buněk k sestavení komplexu II. V tomto případě nemusí dojít k internalizaci receptoru, a sestavený komplex neobsahuje receptor CD95. Nejdůležitější stavební roli zde hraje FADD. Prokaspáza podléhá autokatalytickému štěpení za vytvoření aktivní kaspázy 8. Komplex II je *in vitro* schopen aktivovat i kaspázu 3 (448). Komplex II je tak tvořen prokaspázou 8, cFLIP, FADD, RIP, TRADD a TRAF2. Jak je patrné, do procesu apoptózy se zapojuje i RIP1, jež také obsahuje DD doménu. Jedná se o serinovou treoninovou kinázu, jejíž fosforylace je nezbytná pro aktivaci ERK a polyubiquitinaci a pro NF- κ B aktivaci, což vede buňku k aktivaci a přežití. Deubiquitinace naopak vede ke zvýšení formování komplexu RIP1/FADD/prokaspáza 8, a tím i k apoptóze. DD z RIP1 jsou také potřebné pro apoptotický signál z TNF receptorů (449).

Je tedy patrné, že signalizace CD95/CD95L a konečný výsledek je ovlivněn mnoha faktory, včetně typu buněk. Život buňky nesoucí receptor CD95 může být jeho stimulací prodloužen, ale také ukončen apoptózou. Narušení signalizace se samozřejmě promítá v mnoha patologických procesech, např. u nádorových bujení, kdy rakovinné buňky ve zvýšené míře exprimují CD95L a zároveň snižují expresi CD95. Též se v krvi onkologických pacientů zvyšuje sCD95L. Nádorovým buňkám je těmito mechanismy, včetně toho, že i stimulace CD95 u nich může spustit „kaskádu“ na přežití, jež posílí i jejich invazivitu,

umožněno vyhnout se smrti (450, 451). Naproti tomu se např. u SLE setkáváme se zvýšenou apoptózou následovanou nedostatečným odstraňováním apoptotických buněk (452).



Obr. 9 Signalizace CD95/CD95L

Schematické zobrazení signalizace CD95/CD95L. Molekuly CD95 jsou na membráně v preasociované formě a po vazbě ligandu dochází k aktivaci signálních cest. Aktivace CD95 může vyústit buď v přežití buňky, pokud je aktivována cesta MAPK, a to hlavně v přítomnosti sCD95L, nebo v apoptózu s aktivací kaspáz, pokud je CD95L membránově vázaný. Osud buňky je také dán iniciální koncentrací CD95L. Apoptóze předchází sestavení DISC u typu I i internalizace receptorů klatrin dependentní endocytózou. Výsledkem je tvorba aktivní kaspázy 8 a 10 a dalších kroků vedoucích k aktivaci efektorových kaspáz 3, 6, 7.



81

5. Cíl:

1. Stanovení exprese vybraných povrchových molekul na monocytech a granulocytech v daných časových bodech
2. Zhodnocení dynamiky změn exprese v čase
3. Stanovení koncentrace sCD200R v séru
4. Zhodnocení dynamiky změn v koncentracích sCD200R v čase
5. Posouzení vztahů mezi jednotlivými hodnotami
6. Případné zhodnocení, zda intenzita odpovědi imunitního systému koreluje se změnami exprese sledovaných molekul.
7. Zhodnocení přínosu studie a možnosti dalších kroků

6. Postup a metody:

6.1 PACIENTI, DEMOGRAFICKÁ DATA, KLINICKÉ ASPEKTY

Tato studie byla schválena Etickou komisí Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Do souboru pacientů bylo zařazeno 30 pacientů (19 mužů a 11 žen), kteří byli před zařazením do studie ústně i písemně seznámeni se všemi náležitostmi a před zákrokem podepsali informovaný souhlas, jímž potvrdili svou účast ve studii. Kritérii pro nezařazení či vyřazení ze studie byla např. předoperační infekce, jiná operace v nedávné historii, malignity, vážná dysfunkce levé komory srdeční s poklesem ejekční frakce pod 30 %. Všichni vybraní souhlasící pacienti podstoupili srdeční operaci prováděnou za pomoci mimotělního oběhu. Věk vybraných pacientů se pohyboval v rozpětí 52–84 let. Pacienti měli medián EuroScore, tedy operačního rizika, 5,2; přičemž hodnoty 1–2 představují pacienty s nejnižším rizikem, střední riziko 3–5, vysoké riziko pak představují pacienti s hodnotou EuroScore nad 6. U EuroScore vyšším než 11 je mortalita udávána až 36,5 %, zatímco u EuroScore do 2 je 0,8 % (tab. 8; 453).

Délka operace, zaklappování aorty i krevní ztráty, a stejně tak doba pooperační hospitalizace se u jednotlivých operovaných lišily dle předoperační vážnosti jejich stavu a

náročnosti prováděné operace (tab. 3–7). Ačkoli všichni pacienti podstoupili operaci s použitím MO srdce, výkony na srdci samotném byly rozdílné. U žádného z pacientů nebylo nutné použití mechanické srdeční podpory. U některých pacientů se v pooperačním období vyskytly komplikace v podobě síňových fibrilací, postižení plic, ledvin aj., u dvou pacientů musela být provedena operační revize. Jednalo se o pacienty, kteří již v předoperačním období byli zatíženi nějakou přidruženou chronickou nemocí (tab. 3). Doba hospitalizace se pohybovala od 7 do 58 dnů dle komplikací v pooperačním období.

Tab. 3 Demografická data pacientů

Pacienti (počet)	30
Muži/ženy	19/11
Věk (roky)	68,5 (52–84)
BMI	28,25 (22,7–39,1)
Ejekční frakce (%)	60 (15–75)
Diabetes mellitus (počet)	8
CHOPN (počet)	3
EuroScore (%)	5,2 (1,51–27,18)

Tab. 4 Data týkající se průběhu operace

Délka trvání MO (min)	106 (65–196)
Doba zaklampování aorty (min)	80 (43–137)
Celková krevní ztráta (ml/h)	575/44 (200–3300/41–72)
Pooperační pobyt v nemocnici (dny)	12 (7–58)

Tab. 5 Pooperační komplikace

Pooperační komplikace	Počet pacientů
Výrazný nárůst CRP	2
Síňová fibrilace	7
Chirurgická revize	2
Ledvinné selhání	1
Akutní respirační distress syndrom	2
Systémová zánětlivá reakce	1
Diseminované intravaskulární krvácení	1
Multiorgánové selhání	1
Kardiogenní šok	1
Reoperace	2

Tab. 6 Použití krevních náhrad

Typ krevní náhrady	Počet pacientů
Erytrocytární masa	25
Mražená krevní plazma	9
Trombocyty	3
Srážecí faktor – Protromplex	1
Fibrinogen	2

Tab. 7 Použitá medikace pre-, pooperačně

Doba podání medikace	Podaná medikace	Počet pacientů
Preop.	Statiny	13
	Fibráty	2
Poop.	Antibiotika	5
	Kortikoidy v důsledku operace	3
	Kortikoidy při zhoršení prvotního onemocnění	8
	Inotropní léky	28

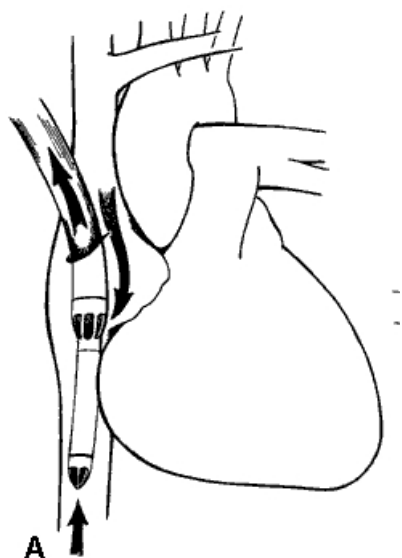
Tab. 8 Mortalita dle EuroScore

EuroScore	Mortalita %
0–2	0,8
3–5	3
6–8	7,4
9–11	16,4
>11	36,5

(Rev Esp Cardiol. 2008;61:567-71. Vol. 61).

6.2 POPIS OPERACE

Všechny prováděné chirurgické zákroky byly prováděny s podporou konvenčního mimotělního oběhu. Krev byla odváděna (drénována) z těla společnou, tzv. two-stage kanylou odvádějící žilní krev z pravé síně a dolní duté žíly a krevní návrat zpět do těla byl zajištěn kanylou zavedenou do vzestupné aorty (obr. 11).



Obr. 11 Žilní armovaná two-stage kanyla

(http://tele.med.ru/book/cardiac_anesthesia/text/gr/gr005.htm#gr005topic003)

Mimotělní oběh sestával z těchto součástí: rotační pumpy (Stöckert Instrumente GmbH, München, Germany), membránového oxygenátoru s integrovaným skládacím zásobníkem, kardiotoického sání arteriální filtr 40 μ s odvodušňovací linkou (Dideco SrL, Mirandola, Italy). Systém mimotělního oběhu nebyl připraven hemokompatibilní substancí. Priming sestával z 500 ml roztoku Ringer laktátu, 500 ml reodextranu (Rheomacrodex), 5,000 IU heparin, 80 ml hydrogen uhličitanu sodného (NaHCO_3 8,4%), 20 ml 10% síranu hořečnatého a manitolu (1 g/kg váhy). Pacientům byl nitrožilně podán heparin v dávce 300 IU/kg, aby došlo k prodloužení aktivovaného částečného tromboplastinového času během operace minimálně na 480 s. Pacientům nebyl intravenózně podán žádný další lék, např. aprotinin nebo kortikosteroidy.

Kardiochirurgické zákroky byly prováděny v normotermii. Kardioplegické zastavení srdce bylo indukováno studeným krevním kardioplegickým roztokem, který složeným z krve a St. Thomasova roztoku (Ardeapharma, Sevetin, Czech Republic) v poměru 4:1. Tento byl aplkován antegrádně do kořene aorty. Opakován byl po 20 minutách. V průběhu napojení na mimotělní oběh byl průtok regulován pumpou tak, aby byla zajištěna perfuze tkání v hodnotách 2,4 l/min/m² povrchu těla a tlak byl na hodnotách mezi 50–60 mmHg. Po ukončení operace bylo podáno heparinové antidotum protamin sulfát v dávce 1:1.

6.2.1 Vedení anestezie

Pacienti podstoupili anestezii v souladu s protokolem kardiochirurgického pracoviště, tj. anestezie byla zahájena podáním thiopentalu a midazolamu. Svalové relaxace se dosáhlo podáním cisakrakuria. Anestezie byla u pacientů dále udržována pomocí izofluranu, který byl doplňován sufentanylem v daných časových rozestupech. V případě nutnosti byla přidána kontinuální infuze s propofolem. Byla monitorována oxygenace a saturace krve kyslíkem FiO₂ 0,5, stejně tak byl udržován střední krevní tlak nad hodnotou 50 mm/Hg, v případě nutnosti zvýšit klesající tlak byl podán noradrenalin.

6.3 LABORATORNÍ METODIKY:

K získání výsledků bylo využito těchto postupů:

- Flow cytometrie – ke zhodnocení exprese povrchových znaků
- ELISA – k určení sérového sCD200R

6.3.1 Odběr a zpracování krevních vzorků

Krev byla odebírána z periferní žíly před, po, 1., 3., 7. den po operaci do vakuové odběrové soupravy s heparinem nebo trombinem (heparinized Vacutainer tubes a thrombin Vacutainer tubes BD; UK).

Koagulované krevní vzorky byly centrifugovány, aby došlo k oddělení séra a krevních buněk. Sérum bylo následně skladováno při teplotě -70°C a poté použito k určení koncentrace solubilního receptoru CD200R pomocí ELISA kitu – ELISA Kit for CD200 Receptor 1 (CD200R1) – sandwich enzyme immunoassay (USCN; China) se senzitivitou 0,55 ng/ml. Výrobce bylo deklarováno, že při detekci sCD200R nedochází ke zkřížené reaktivitě s jinými podobnými proteiny, jako např. CD200R2.

Heparinizované krevní vzorky byly zpracovány okamžitě po odebrání. Do plné krve (50 μl) byly přidány značené protilátky (2,5 μl) a vzorky inkubovány při pokojové teplotě ve tmě po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby bylo přidáno lyzační činidlo – 200 μl hypotonického roztoku NH_4Cl (OptiLyse, Immunotech, France) k lýze erytrocytů při pokojové teplotě v šeru po dobu 10 minut. Po této době byl přidán 0,5 ml PBS a vzorky byly zcentrifugovány (300 g po dobu 5 minut), promyty, supernatant resuspendován. Takto připravené vzorky byly analyzovány průtokovým cytometrem.

Veškeré použité značené protilátky byly myší izotypu IgG1 specifické pro lidské antigeny.

Anti-CD200R FITC (clone OX-108) (Serotec; UK)

CD95L PE (clone 14C2) (Serotec; UK)

anti-CD95 PE (clone UB2) (Beckman Coulter; CR)

anti-CD14 (clone MEM-241) (Exbio; CR)

izotypová kontrola myší IgG1 FITC a IgG1 PE (Caltag Laboratories; USA)

6.3.2 Přístrojové a programové vybavení

Data byla získána na FACS Calibur flow cytometer, jenž je pravidelně kalibrován pomocí CaliBRITE beads za použití FACSCComp software (BD; USA), za použití softwaru CellQuest (BD; USA) a výsledky byly vyhodnoceny programem FlowJo (Tree Star; USA).

Expresí povrchových molekul CD200R a CD95 na monocytech a granulocytech je vyjádřena jako MFI (median fluorescence intensity) a zastoupení buněk exprimujících značený znak je vyjádřeno jako procento pozitivních CD200R⁺ a CD95⁺ z celkové populace zkoumaných buněk.

6.4 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Výsledky byly hodnoceny statistickým softwarem Statistica 10 (Statsoft, USA) za využití těchto metod:

Shapiro-Wilkův test normality

Levenův test homogenity rozptylů

ANOVA

Friedmanova analýza pro znáhodněné bloky

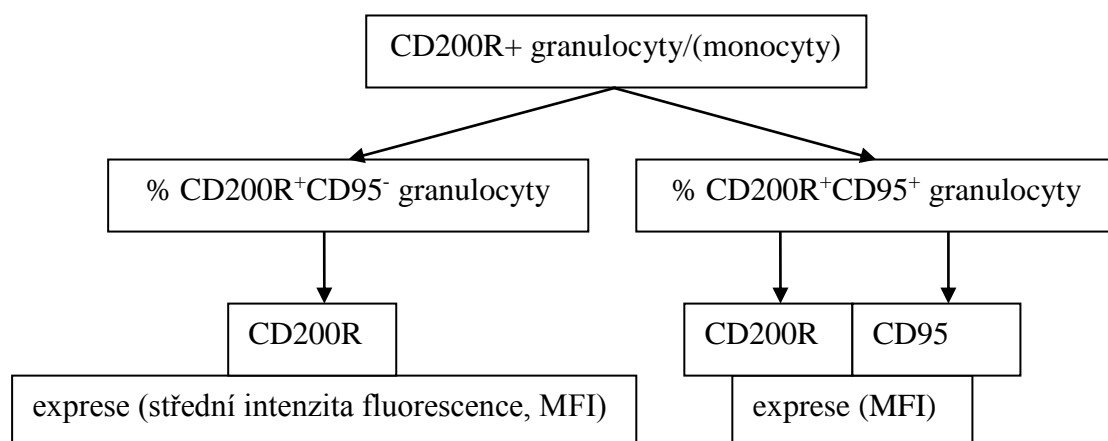
Post hoc analýza zahrnovala Dunnettův test či Wilcoxonův test.

Rozdíl na hladině $p \leq 0,05$ byl považován za statisticky významný.

Výsledkové hodnoty jsou uváděny jako medián, není-li uvedeno jinak. Grafy znázorňují medián, kvartil a rozsah neodlehlých hodnot.

7. Výsledky

Zkoumané znaky a populace (tab. 9)



Tab. 9 Přehled naměřených hodnot na granulocytech a monocytech

	před op.	po op.	1. den	3. den	7. den
granulo CD200R ⁺ %	5,0	17,8	14,9	14,6	13,1
granulo CD200R ⁺ CD95 ⁻ %	4,3	17,5	11,4	6,4	8,8
granulo CD200R ⁺ CD95 ⁺ %	0,51	0,23	0,60	2,06	1,15
granulo CD200R ⁺ CD95 ⁺ MFI CD95	47,1	46,2	44,8	46,7	45,5
granulo CD200R ⁺ CD95 ⁺ MFI CD200R	49,6	45,0	46,6	45,3	45,6
granulo CD200R ⁺ CD95L ⁺ MFI CD95L	57,8	50,2	59,3	80,3	60,1
mono CD200R ⁺ %	30,6	33,4	49,4	40,9	19,8
mono CD200R ⁺ CD95 ⁻ %	21,1	25,8	24,5	13,2	10,0
mono CD200R ⁺ CD95 ⁻ MFI CD200R	25,5	27,2	26,9	26,4	25,0
mono CD200R ⁺ CD95 ⁺ %	4,0	4,7	26,0	21,5	6,6
mono CD200R ⁺ CD95 ⁺ MFI CD200R	28,4	31,6	33,4	29,9	27,6
mono CD200R ⁺ CD95 ⁺ MFI CD95	36,1	36,4	42,7	40,8	38,6
koncentrace sCD200R1	96	294	105	78	93

7.1 EXPRESE ZNAKU CD200R, CD95 A CD95L NA GRANULOCYTECH

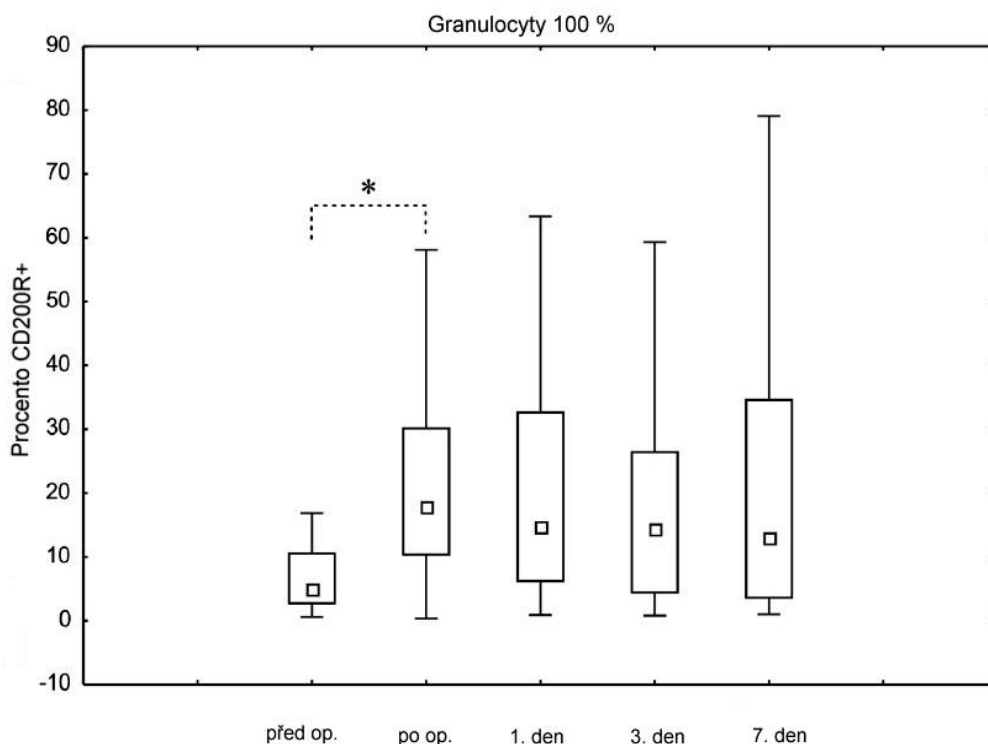
V předoperačních krevních vzorcích není relativní zastoupení granulocytů nesoucích znak CD200R vysoké. Činí 5 %. Situace se ovšem výrazně mění ve vzorcích odebraných po provedené operaci. V 1. pooperačním vzorku se hodnota relativního zastoupení granulocytární populace nesoucí znak CD200R zvýšila více než 3,5násobně, tvořila 17,8 %. Následující dny docházelo k pomalému poklesu, i přesto je poslední měřená hodnota, tj. 7. pooperační den signifikantně vyšší než předoperační, a to 13,1 % (graf 1).

Vzhledem k tomu, že je CD200R inhibiční molekulou, je zvýšení počtu granulocytů ji nesoucích známkou snahy imunitního systému snížit zánětlivou odpověď, korigovat ji a chránit tak organismus před poškozením z přemíry aktivity imunitního systému. Ačkoli došlo k významnému zvýšení relativního zastoupení granulocytů, které exprimovaly molekuly CD200R, denzita její exprese se nezvýšila, naopak u granulocytární subpopulace CD95⁺CD200R⁺ se dokonce snížila (graf 2).

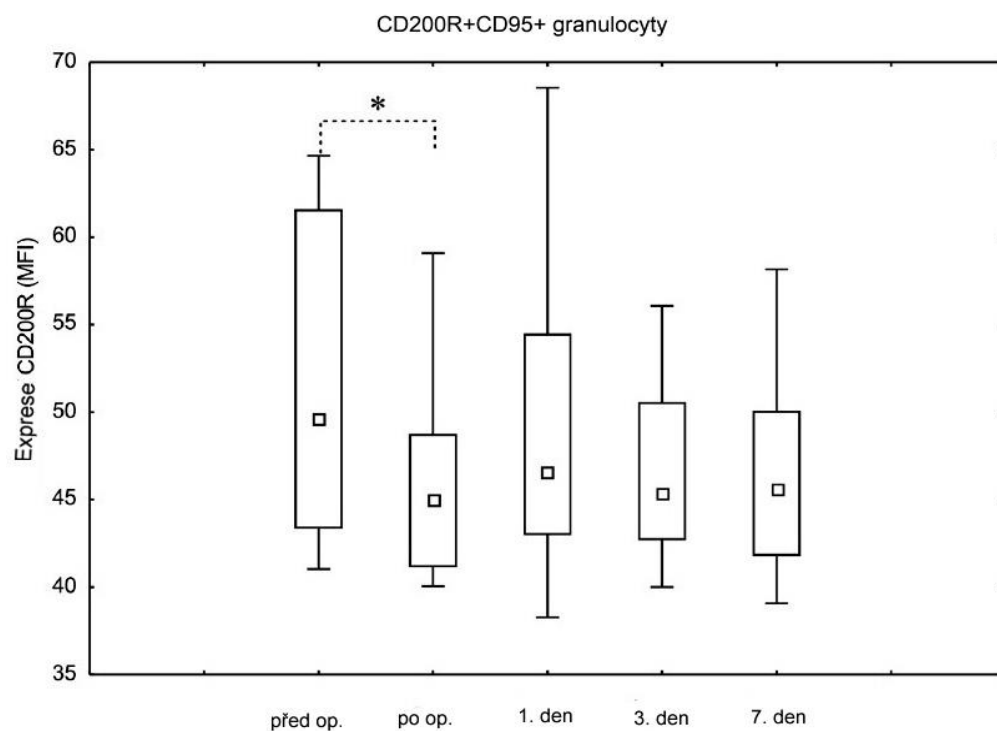
Molekulu CD200R⁺ exprimovala jak majoritní subpopulace CD95⁻ (~ 90,6 % CD200R⁺ granulocytů, data nejsou zobrazena), tak subpopulace aktivovaných CD95⁺ granulocytů. Jak je patrné, většina granulocytů postrádala molekulu CD95, tedy molekulu regulující apoptózu, ačkoli byl předpoklad, že by mohlo dojít k nárůstu právě subpopulace CD95⁺. Navíc ani intenzita exprese CD95 na CD200R⁺CD95⁺ nerostla, naopak. Z původní hodnoty MFI 47,1 se 3. den dostala na hodnoty 44,8, i přes mírný nárůst v dalších dnech, nedošlo ani poslední sledovaný den k vyrovnání výchozí hodnoty. Tyto změny ovšem nejsou statisticky významné (graf 3). Již bylo zmíněno, majoritní granulocytární subpopulací byla v našich vzorcích CD200R⁺CD95⁻ a právě její relativní zastoupení v pooperačním období ve vzorcích vzrostlo, a to ze 4,3 % na 17,5 %. Rychlý nárůst provázal i poměrně rychlý pokles, kdy nejnižší hladina, krom počáteční hodnoty, byla naměřena 3. den, a to 6,4 % (graf 4). Jiná dynamika změn byla zachycena u subpopulace CD200R⁺CD95⁺, kdy okamžitě po operaci došlo ke snížení hodnoty oproti předoperační z 0,51 na 0,23, a až následně došlo k jejich růstu do maxima, které nastalo 3. pooperační den, kdy hodnota dosáhla 2,06 (graf 5). Jak již bylo zmíněno výše, zajímavým jevem byl pokles intenzity exprese CD200R molekuly na granulocytární subpopulaci exprimující CD95⁺. Tato klesla z předoperační hodnoty 49,6 na 45,0 MFI (graf 2). Do posledního sledovaného pooperačního dne se hodnota nezvýšila do takové míry, aby dosáhla hodnoty předoperační. Podobnou dynamiku měla na populaci CD200R⁺CD95⁺ i molekula CD95. Nejvýraznější pokles se však dostavil 1. den po operaci a

exprese se v průběhu sledovaného období již nevrátila k předoperační hodnotě. Expresa molekuly CD200R na granulocytární subpopulaci CD200R⁺CD95⁻ taktéž doznala v prvním měřeném času mírný pokles ze 41,4 na 40,3, ale další měřená hodnota již vykazovala nárůst nad baseline s návratem k hodnotě předoperační. Rozdíly v hodnotách ovšem nejsou statisticky významné (graf 6).

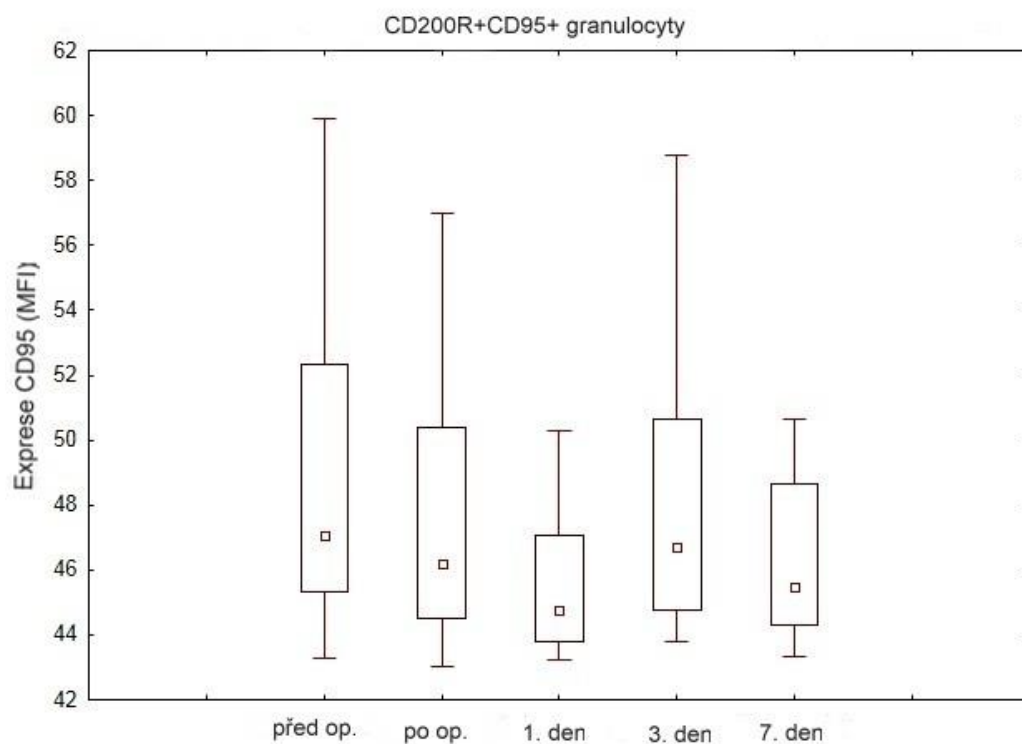
Taktéž byla zkoumána exprese ligandu pro CD95, tedy CD95L. Relativní zastoupení granulocytů exprimujících současně CD200R a CD95L se v průběhu sledovaného časového úseku nezměnilo. Navíc se nezměnila ani síla exprese CD200R na této subpopulaci, jedinou zásadní změnou tak zůstala změna MFI, jež měla velmi kolísavý charakter. Po prvotním poklesu z 57,8 na 50,2 došlo k nárůstu s maximem 3. pooperačního dne, a to na hodnotu MFI 80,3. Poslední měřená hodnota pak opět klesla na hodnotu blízkou počáteční, tedy na 60,1 (graf 7).



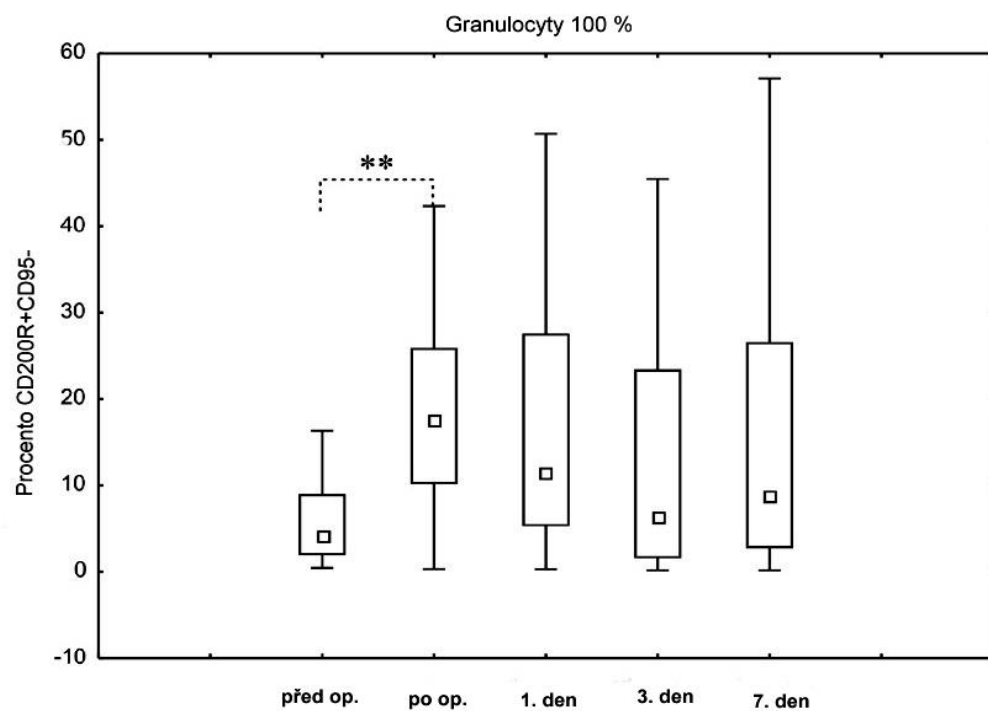
Graf 1 Relativní zastoupení CD200R⁺ granulocytů v granulocytární populaci (* p < 0,05)



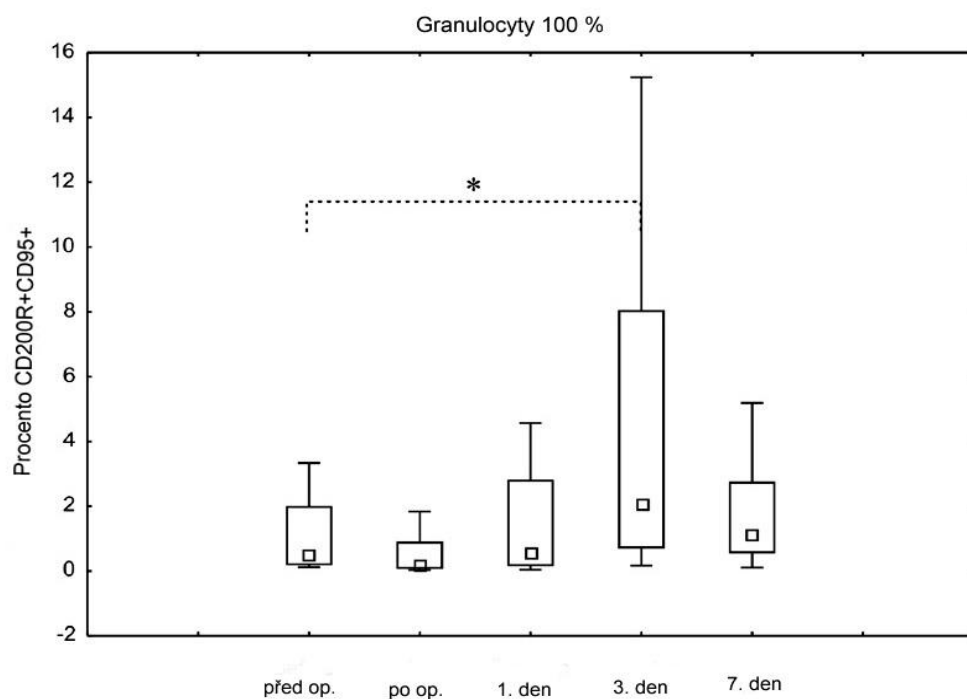
Graf 2 MFI hodnoty exprese CD200R na CD200R⁺CD95⁺granulocytech (* p< 0,05)



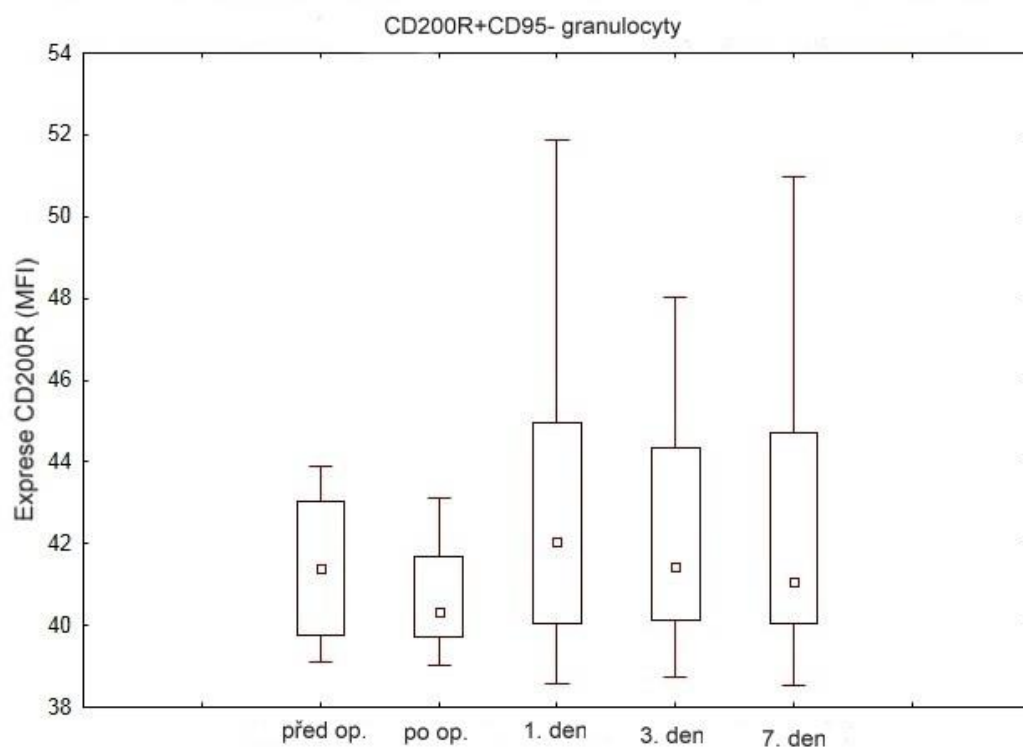
Graf 3 MFI hodnoty exprese CD95 na CD200R⁺CD95⁺ granulocytech



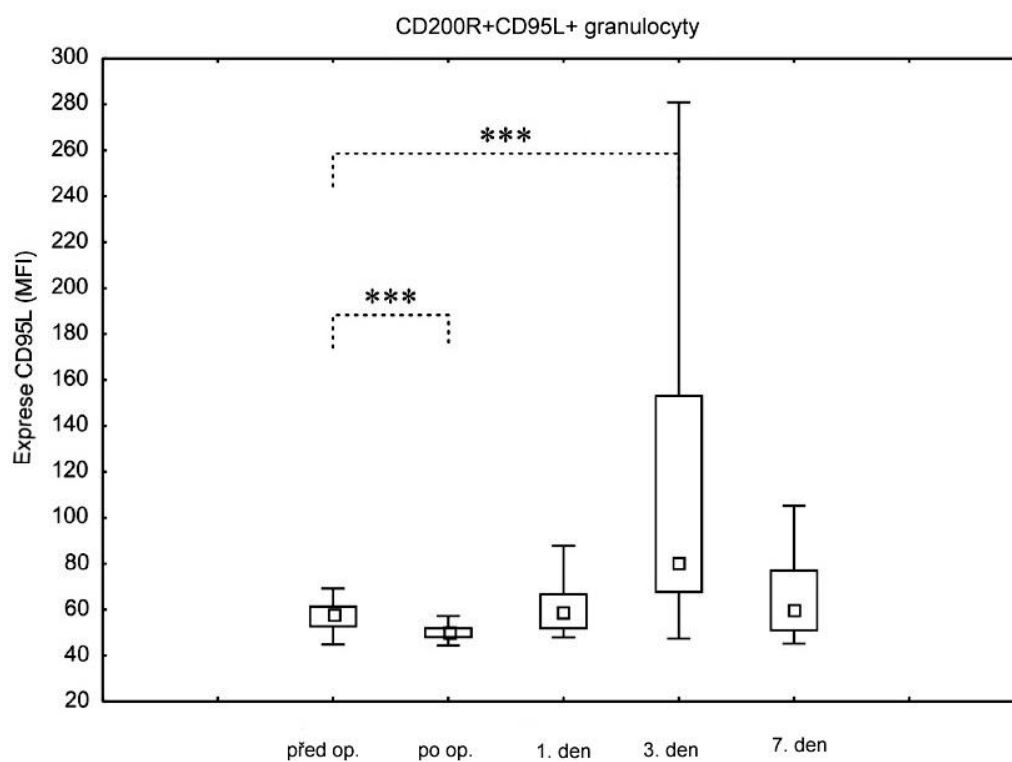
Graf 4 Relativní zastoupení CD200R⁺CD95⁻ granulocytů v granulocytární populaci
(** p<0,01)



Graf 5 Relativní zastoupení CD200R⁺CD95⁺ granulocytů v granulocytární populaci
(* p< 0,05)



Graf 6 MFI hodnoty exprese CD200R na CD200R⁺CD95⁻ granulocytech



Graf 7 MFI hodnoty exprese CD95L na CD200R⁺CD95L⁺ granulocytech (***) $p < 0,001$)

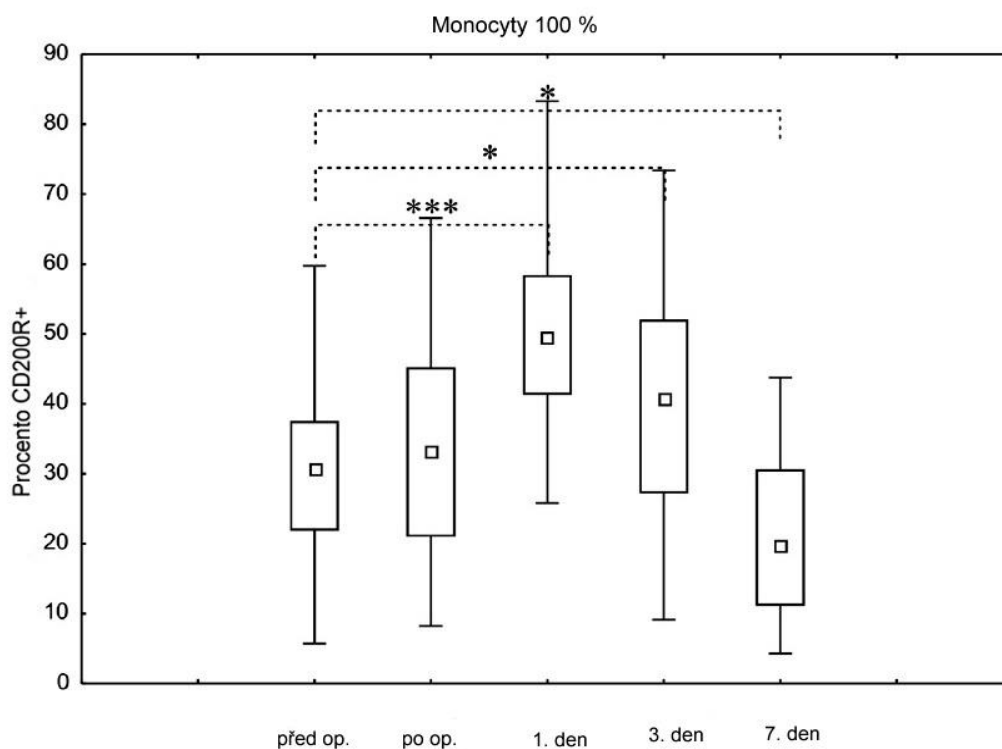
7.2 EXPRESE SLEDOVANÝCH MOLEKUL CD200R A CD95 NA MONOCYTECH

Monocytární populace stejně jako ta granulocytární reaguje na operaci změnami v expresi mnoha molekul, včetně těch námi sledovaných. Relativní zastoupení monocytů nesoucích molekulu CD200R výrazně vzrostlo během prvních 3 dní, a to z 30,6 na 49,4 %. Dále docházelo k poklesu, který 7. den skončil hluboko pod předoperační hodnotou, tj. 30,6 a 19,8 %, na rozdíl od granulocytů, kde se hodnoty nesnížily ani k té předoperační (graf 8).

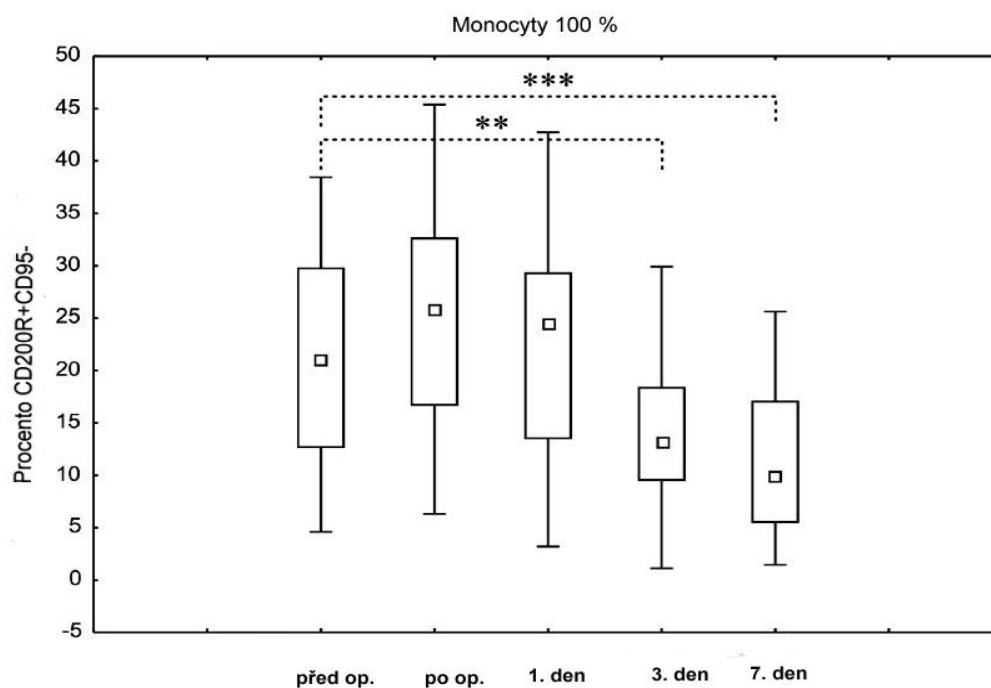
V monocytární populaci stejně jako v té granulocytární převažovala v předoperačním období subpopulace CD200R⁺CD95⁻. Její relativní zastoupení v pooperačním období mírně vzrostlo, a to z 21,1 na 25,8 %, ale následně došlo k hlubokému propadu, 7. den činila hodnota 10,0 % (graf 9). Krom toho se zvýšila i MFI CD200R na monocytech, jež nenesou znak CD95. Maximální hodnoty exprese CD200R bylo dosaženo ve vzorku odebraném bezprostředně po provedené operaci, kdy hodnoty stouply z 25,5 na 27,2. V dalších dnech docházelo k postupnému poklesu až na úroveň pod vstupní předoperační hodnotu, tj. 7. pooperační den byla hodnota MFI CD200R na CD95⁻ monocytech 25,0 (graf 10).

Větší změny potom byly zachyceny v subpopulaci, která byla v předoperačním období minoritní, tedy v CD200R⁺CD95⁺. Zde došlo k výrazné expanzi této subpopulace ze 4,0 na 26,0 % naměřených 3. pooperační den (graf 11). Nárůst relativního zastoupení subpopulace CD200R⁺CD95⁺ byl následován i nárůstem MFI CD200R. Z počáteční předoperační hodnoty 28,4 došlo k nárůstu na 33,4 ve vzorku z 1. pooperačního dne s poklesem pod předoperační hladinu 7. den, tj. na 27,6 (graf 12).

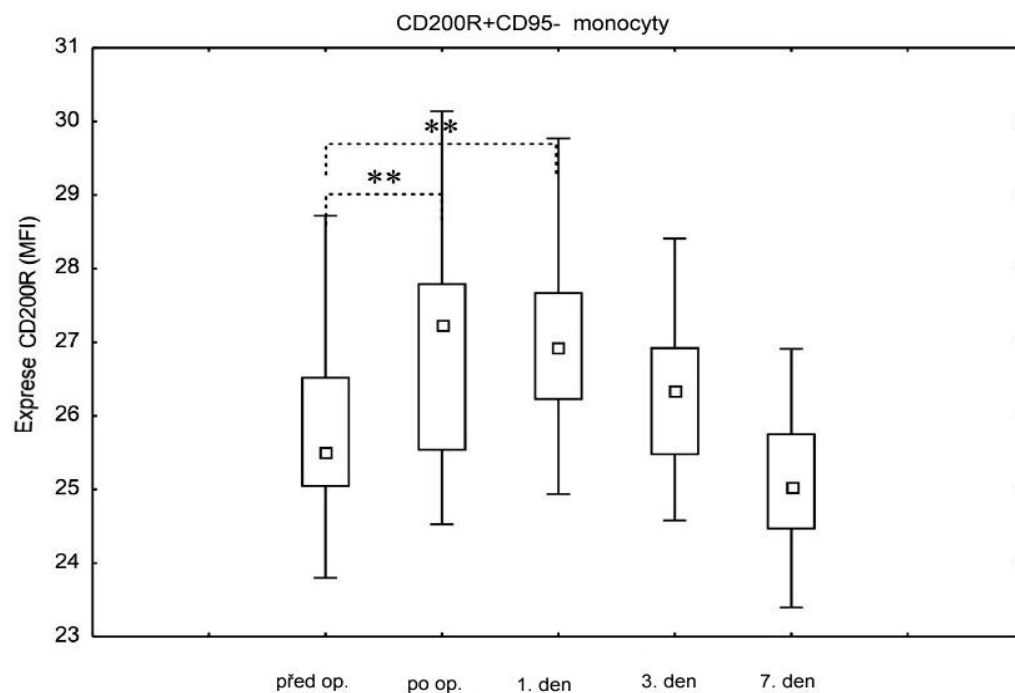
Krom zvýšení intenzity exprese CD200R vykazala monocytární subpopulace CD200R⁺CD95⁺ i zvýšení exprese molekuly CD95. Nejvyšší CD95 MFI byla naměřena 3. pooperační den, kdy dosáhla hodnoty 42,7 z původních 36,1 (graf 13). Je tedy patrné, že zvýšení intenzity exprese CD200R bylo rychlejší než u CD95, ale zároveň byl i pokles výraznější, zatímco u CD200R se 7. den hodnota dostala pod předoperační hodnotu, u CD95 byla i 7. den hodnota MFI vyšší než předoperační. Tento fakt může mít regulační vliv na počet monocytů exprimujících CD200R.



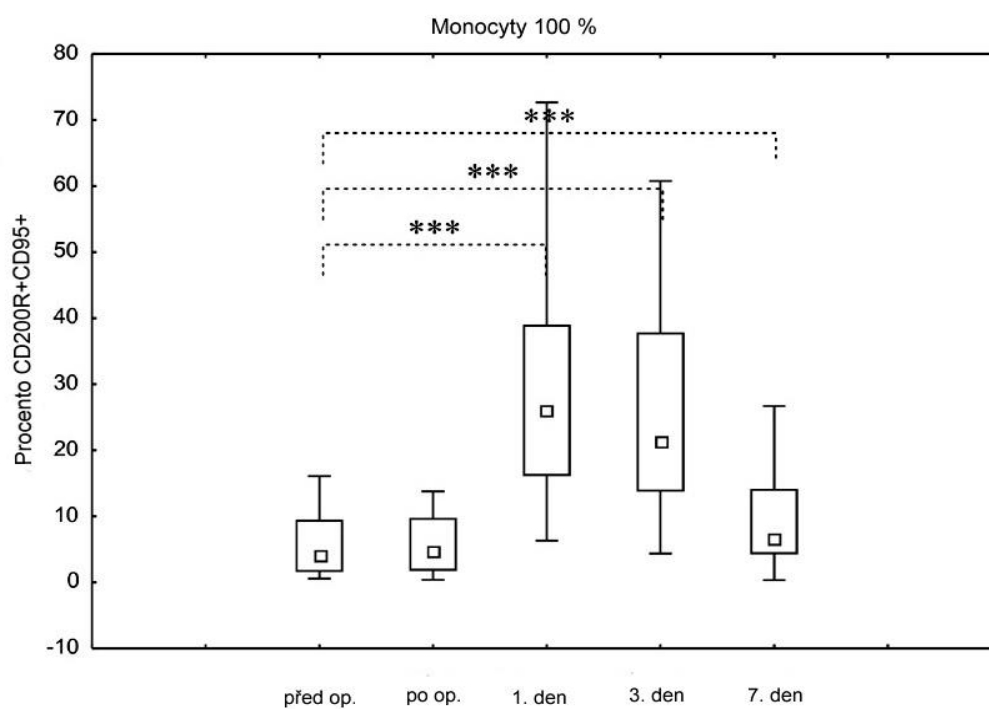
Graf 8 Relativní zastoupení CD200R⁺ monocyty v monocytní populaci (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)



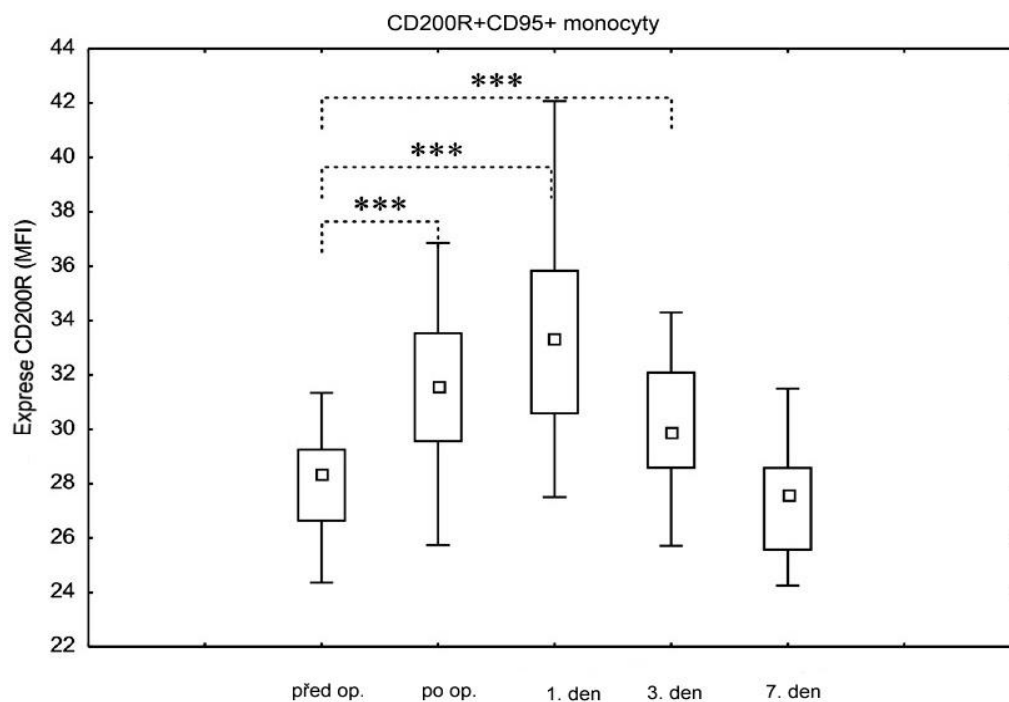
Graf 9 Relativní zastoupení CD200R⁺CD95⁻ monocyty (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)



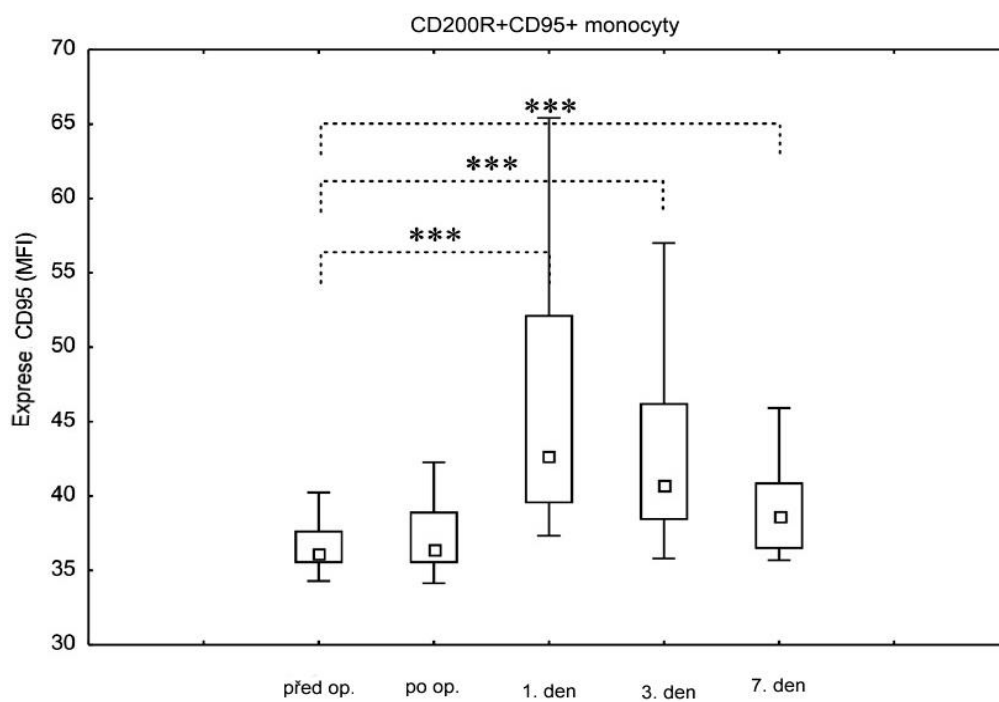
Graf 10 MFI hodnoty exprese CD200R na CD200R⁺CD95⁻ monocyttech (** p<0,01)



Graf 11 Relativní zastoupení CD200R⁺CD95⁺ v monocytární populaci (***) p<0,001)



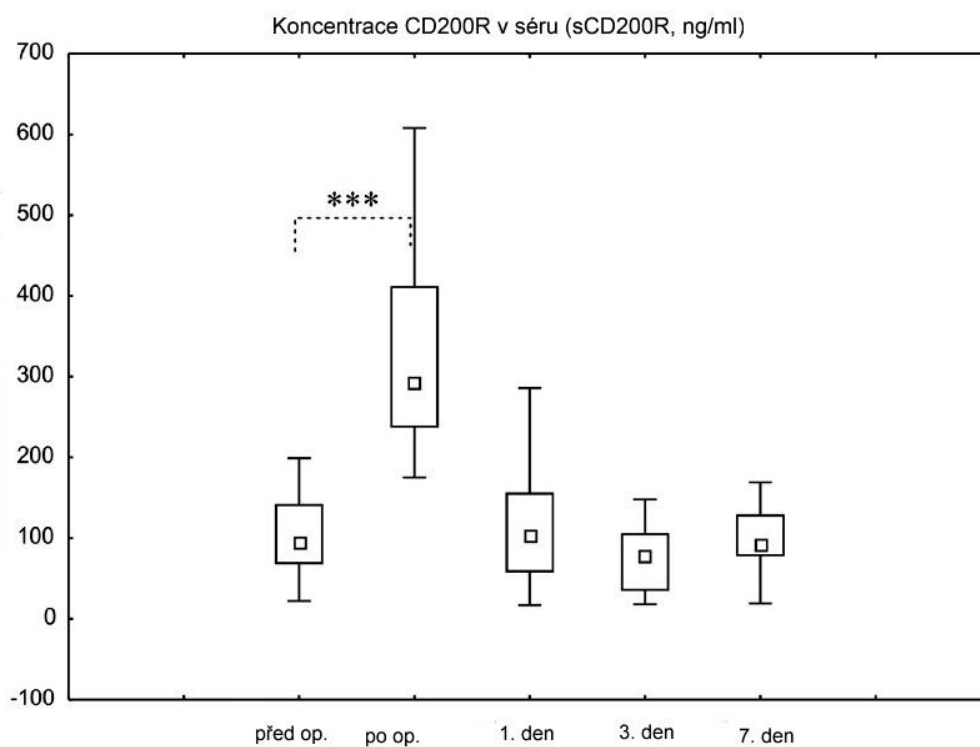
Graf 12 MFI hodnoty exprese CD200R na CD200R⁺CD95⁺ monocyttech (***) $p < 0,001$)



Graf 13 MFI hodnoty exprese CD95 na CD200R⁺CD95⁺ monocyttech (***) $p < 0,001$)

7.3 SÉROVÁ KONCENTRACE SOLUBILNÍHO RECEPTORU CD200R

Nejen hodnoty exprimovaných molekul byly operací ovlivněny. Ušetřen nezůstal ani receptor CD200R ve své solubilní podobě. Jeho koncentrace v séru prudce a výrazně stoupla okamžitě po operaci, a to z 96 na 294 ng/ml, přičemž snížení exprese CD200R byla zachycena jen u granulocytární subpopulace CD200R⁺CD95⁺. Další měřené hodnoty měly sestupný charakter, pouze poslední měřený den došlo opět k mírnému zvýšení oproti 3. dnu (graf 14). Dalo by se říci, že koncentrace sCD200R kopírovala v období po operaci a 1. den změny exprese CD200R u CD200R⁺CD95⁺.



Graf 14 Sérová koncentrace sCD200R (***) $p < 0,001$

8. Diskuse

Jak již bylo zmíněno v předchozím textu kardiochirurgický zákrok jakkoli dobře a šetrně provedený, při němž nedojde k žádným komplikacím, může nakonec vyústit v závažnou systémovou zánětlivou reakci, a ohrozit tak nejen pacientovo zdraví, ale i život. Ke snížení výskytu peri- i pooperačních komplikací jsou voleny i jiné než jen klasické operační postupy, a i ve studiích provedených na našich pracovištích se ukazuje, že např. off-pump či miniinvazivní typ operace mívají menší dopad na pacienta, tedy i na jeho imunitní systém ve smyslu aktivace či deprese reaktivity. Samozřejmě zde hraje roli i volba použitého biomateriálu v mimotělním oběhu, podaná medikace, anestezie atd. (453–456). Není však typ operace, k němuž by se nepojila i odpověď imunitního systému. Dochází tak k rozvoji různě vyjádřené systémové zánětlivé odpovědi (SIRS). Na poli SIRS jsou lépe zmapovány aktivační mechanismy, ale stále důležitějším se jeví dobré zmapování a pochopení inhibičních mechanismů, které vedou k utlumení, kompenzaci imunitní reakce, která může být svou intenzitou pacienta poškozující, nebo naopak, aby se neprohloubila dočasná přechodná paralýza imunitního systému provázená poklesem počtu leukocytů, poklesem exprese některých povrchových molekul jako HLA-DR či zvýšenou expresí inhibičních molekul CD200R společně s alterací exprese, tedy snížením či zvýšením, některých cytokinů TNF α , IL-10. Tyto jevy utlumující aktivitu imunitního systému pak vedou k větší náchylnosti ke vzniku komplikací v podobě infekcí a septických stavů, jež mohou končit fatálně (457–461).

Pro zdraví člověka je důležité, aby byly imunitní pochody v rovnováze či se do ní co nejdříve po stresové situaci (v tomto případě kardiochirurgické operaci, kdy je zánětlivá reakce v určité míře žádoucí, neboť podporuje hojení či boj s infekcí) opět dostaly.

V SIRS jsou zapojeny složky vrozené i adaptivní imunity obojí povahy, jak buněčné, tak humorální. Důležitou roli v rozvoji zánětu sehrávají buňky nespecifické imunity, monocyty a granulocyty, i proto se tato studie soustřeďuje právě na ně. Je nesporné, že tyto dvě populace intenzivně reagují na provedený chirurgický zákrok, jak dokazují i námi získané výsledky, jež se shodují s předešlými prováděnými studiemi (462, 463). Chirurgický zákrok může změnit jak jejich počet, tak i fenotyp, a tím i jejich funkci a aktivitu. Může se např. snížit apoptóza u neutrofilů, ale zvýšit jejich respirační vzplanutí, snížit odpovědávost při stimulaci Toll like receptorů (460, 464). Mění se exprese nejen námi sledovaných molekul, ale i např. HLA-DR, CD 40, CD80/86, CD64, CD162, CD 166, CD195 (466–470). Změny

exprese námi zvolených molekul patří mezi kompenzační a inhibiční mechanismus odrážející i aktivaci imunitního systému.

Molekuly CD200R a CD200 mají inhibiční charakter. Jedná se o účinek přímý, kdy dojde k ovlivnění aktivity efektorové buňky, či nepřímý, např. aktivací IDO, podpory vývoje T lymfocytů do subsetu Treg. K nepřímým vlivům pak patří i snížení exprese ICAM-1 na imunitních buňkách nesoucích CD200R, které přichází do kontaktu s endotelovými buňkami, které v zánětlivém mikrostředí zvyšují expresi CD200, čímž je omezena i migrace imunitních buněk z krevního řečiště do tkání, neboť jsou imunitní buňky inhibovány (455, 471, 472). Zatímco CD200R a jeho ligand jsou tedy v současné době označovány za inhibiční molekuly, u molekuly CD95 není situace tak jednoznačná. Má dvojí roli, schopnost prodlužovat život buněk, působí protiapoptoticky, podporovat a zvyšovat produkci cytokinů, a tím se zasazovat o udržování a zesilování zánětlivé reakci, na druhou stranu má schopnost inhibovat aktivitu imunitního systému, a to hlavně navozením apoptózy aktivovaných imunitních buněk (473).

V souladu s poznáním, že aktivaci imunitního systému provází i kompenzační reakce, jsme předpokládali, že společně s aktivací imunitního systému se zvýší exprese i relativní zastoupení buněčných populací nesoucích námi sledované tlumivé molekuly v pooperačním období. Jelikož je v této oblasti stále relativně malé množství studií, které by doplňovaly naše výsledky, s nimiž bychom své výsledky mohli porovnat, můžeme mnohdy pouze vyvozovat jednotlivé závěry.

Dle předpokladů došlo v pooperačním období ke zvýšení počtu leukocytů nesoucích inhibiční molekulu CD200R. Granulocyty reagovaly na chirurgický zákrok, a tím i prozánětlivé prostředí pohotověji, již první pooperační hodnoty byly těmi maximálními, ale setkali jsme se i s poklesem exprese CD200R u jedné ze sledovaných subpopulací granulocytů viz dále. Monocyty reagovaly, co se exprese molekuly CD200R týká, pomaleji s maximem 1. pooperační den, právě v této době u nich dochází také k nejvyššímu poklesu exprese TLR4 a HLA-DR a myeloperoxidázy dle Sbranovy studie (469). Je otázkou, nakolik jsou právě tyto jevy propojeny se zvýšenou expresí inhibiční molekuly.

Vzhledem k tomu, že jsou právě neutrofily považovány za iniciátory zánětlivé pooperační reakce, lze tedy vyvodit i jejich rychlejší reakci jak směrem k aktivitě, tak směrem k inhibici, jsou i náchylnější ke spontánní i apoptotickými stimuly navozené apoptóze než třeba monocyty či eozinofily (474). Je možné, že právě proto, aby nedocházelo k velkým apoptotickým ztrátám neutrofilů, dominuje i v pooperačním období populace, která na svém

povrchu nenesí CD95. K masivnímu, více než čtyřnásobnému nárůstu této populace dochází bezprostředně po operaci a následuje ji i poměrně rychlý pokles, nikoli však až na výchozí hodnotu či pod ni. Tato CD95 negativní populace je pak výrazným nositelem inhibiční molekuly CD200R. Jak je patrné, tak neutrofilů, které méně podléhají apoptóze, žijí delší dobu, mohou být inhibovány, a tím jsou omezeny jejich funkce a prozánětlivé působení. Naopak se pak samy zapojují do suprese imunitní odpovědi, když takto inhibované buňky mění expresi povrchových molekul i syntézu cytokinů, např. ve prospěch IL-10. Snížení a oddálení apoptózy u granulocytů bylo potvrzeno v mnohých studiích, jedna z nich sleduje příčinnou souvislost mezi hladinami IL-6 a GM-CSF či IL-8, jejichž produkce se zvyšuje (474–478). Na druhou stranu existují i studie, které přinášejí opačné výsledky, např. Deloguova studie, popisuje zvýšenou apoptózu v prvních 24 pooperačních hodinách, což mohou zapříčinit zvýšená exprese TNF α a IL-10 a samozřejmě taky výrazný nárůst ROS (479). Naproti tomu v populaci monocytů se zvyšuje procento, které nese apoptotickou molekulu CD95, a přesto se i zde můžeme setkat s oddálenou apoptózou. Vědci se domnívají, že za oddálenou apoptózou mohou stát zatím přesně neidentifikované antiapoptotické sérové faktory, stejně jako již nastíněný vliv změny koncentrací cytokinů, přítomnost LPS a také pokles aktivity kaspázy-3 (475, 480, 481). Dalo by se uvažovat i o tom, že v tomto procesu oddálení apoptózy může hrát roli i exprese CD200R a jeho aktivace. CD95⁺ populace po krátkém snížení kontinuálně narůstá, její vrchol přichází v době nejnižší pooperační hodnoty CD95⁻ populace.

U granulocytů bylo, i přes relativní nárůst populace CD200R⁺CD95⁺ 1.–7. pooperační den, také zachyceno pooperační snížení exprese CD95, které ani poslední měřenou hodnotou nedosahuje výchozího bodu. Je možné, že je právě tato populace zdrojem sCD95, jelikož dle jiných studií právě v prvních hodinách po operaci vzrůstá sérová hladina sCD95 (482–484). sCD95 má původ v alternativním sestřihu mRNA, ale hlavně v proteolytickém štěpení membránově vázané molekuly. V pooperačním období se zvyšuje aktivity metaloproteináz, které tyto molekuly odštěpují. Pokles exprese CD95 tak nemusí být způsoben sníženou expresí a exprese mRNA pro CD95 může být i zvýšena (470, 485).

Krom molekul CD200R a CD95 došlo ke změně exprese i u CD95L na CD200R granulocytech. Po pooperačním snížení exprese jsme zachytili výrazný nárůst. Pokud porovnáme naše výsledky s jinými dostupnými, nacházíme jisté rozdíly. Vždy je však samozřejmě nutné brát v potaz prostředí, okolnosti, za nichž studie vznikla. U studie provedené Marsikovou je zachyceno výrazné zvýšení koncentrace sCD95L do 4 hodin po

podání LPS, jímž stimulovala dobrovolníky. To by mohlo dopovídat poklesu CD95L, který jsme zachytili, včetně toho, že je v tomto období snížena i exprese mRNA pro CD95L, ta pak do 24 hodin vrůstá na výchozí hodnotu. Je otázkou, zda i v dalším časovém období roste a zda je následována i zvýšenou expresí CD95L, jak jsme zachytili my, kdy maximální hodnoty bylo dosaženo 3. pooperační den. Sem již pokusy Marsikové nesahají, týkají se jen časového období 0–24 hodin (486). Zvýšení exprese CD95L pak také potvrdily výsledky Papathanassogloua. Ten však hodnotil expresi CD95L na mononukleárech. V tomto případě pak exprese výrazně souvisela s klinickým stavem pacienta. U pacientů se středně těžkou SIRS exprese dokonce poklesla, u těžké SIRS naopak stoupala (483). Výsledky Paunel-Görgülüové nejsou ve shodě s výše zmíněnými ani našimi. Ve své studii nezaznamenal nárůst exprese CD95L, ale ani její statisticky významný pokles, což samozřejmě může být dáno výběrem pacientů, kteří sice splňovali podmínku přítomnosti SIRS, ale nepodstoupili kardiokirurgický zákrok (487). Její předchozí studie týkající se antiapoptotické molekuly, jejíž exprese je zvýšená při SIRS, se také věnovala expresi CD95 a CD95L, resp. expresi jejich mRNA. Obě hodnoty pak v čase rostou a jsou zvýšené i 11. den, takže by se dalo předpokládat, že i hodnoty u Marsikové by dále rostly a dostaly by se nad výchozí hodnotu (488).

Zvýšená intenzita exprese CD95L může být provázena zvýšenou apoptózou při vazbě ligandu na CD95, a působit tak protizánětlivě, u neutrofilů pak i samoregulačně. Situace ovšem není černobílá, a i vazba známá jako apoptózu vyvolávající získává jiné vlastnosti v podobě snížení migrace leukocytů, produkce ROS, IL-8 i TNF α . Pokusy toto potvrzující se prováděly v tzv. LIM – leukocyte inhibitory model, jenž je součástí mimotělního oběhu. Obsahuje matrix (polyuretan), na kterém jsou kovalentně navázány CD95 stimulující protilátky. V případě použití u kardiokirurgických zákroků se snížila i hladina CK-MB reflektující myokardiální poškození. Stimulace CD95 tedy za určitých podmínek může působit protektivně. Na druhou stranu je i mnoho studií dokazujících, že vazba CD95/CD95L zvyšuje produkci prozánětlivých cytokinů a místo podpory ukončení zánětlivého stavu jej může udržovat a zesilovat (489–493).

U monocytů se situace týkající se molekuly CD95 jiná. Obě CD200R⁺ populace monocytů zvyšují relativní zastoupení. Nárůst je však následován poklesem, který je u CD200R⁺CD95⁻ hluboko pod výchozí hodnotu. U CD200R⁺CD95⁺ je pokles pomalejší, ačkoli by se vzhledem ke zvýšené náchylnosti k apoptóze dalo předpokládat, že to bude právě tato populace, jejíž pokles bude výraznější. Navíc jsme byli svědky i zvýšení exprese

molekuly CD95, stejně jako jiní ve svých studiích, kdy např. CD14⁺ monocyty kultivované se sérem lidí se SIRS vykazují výrazně vyšší expresi CD95 (494). CD95 expresi zvyšuje i aktivace IRF-1 pomocí INF- γ , jehož exprese se v průběhu zánětlivých reakcí zvyšuje. Dalším prvkem je pak i možné ovlivnění/zvýšení exprese CD95 glukokortikoidy, které ovšem zvyšují i jejich uvolnění z membrány (495, 496). Pokud bychom jednoznačně přijali, že CD95 je molekulou „nosící“ smrt, byly by CD95⁺monocyty senzitivnější na stimuly vedoucí k apoptóze. Je prokázáno, že vazba CD95 s CD95L je provázána nejen apoptózou, ale i změnou produkce cytokinů protizánětlivých i prozánětlivých, jsou to např. IL-10, IL-8, TNF α , zvyšuje tedy i produkci neutrofilních chemoatraktantů (497, 498).

Co se samotné molekuly CD200R týká, předpokládali jsme, že dojde k nárůstu její exprese, zvláště poté, co jsme zachytili nárůst populace nesoucí tuto molekulu. Překvapivě se však ukázalo, že zvýšení relativního zastoupení granulocytů nesoucích CD200R molekulu není doprovázené zvýšením její exprese, je tomu ovšem naopak. V literárních zdrojích je opakovaně zachycováno zvýšení exprese CD200R v důsledku zánětlivé reakce, což se ovšem v našem případě nepodařilo potvrdit u granulocytů. Jaký je tedy rozdíl mezi mechanismy, vnějšími faktory a také citlivostí na ně, které by rozdílně ovlivnily expresi CD200R na monocitech a granulocytech? Neboť u monocytů je situace zcela jiná. Stejně jako u granulocytů roste populace nesoucí CD200R, a to jak CD200R⁺CD95⁺, tak i CD200R⁺CD95⁻. Rozdíl pak nastává v samotné expresi CD200R, ta se u monocytů zvyšuje. Zvýšení je dočasné a na konci sledovaného časového úseku se hodnota MFI CD200R dostává na hodnoty blízké těm výchozím.

Lze se zamyslet nad postavením rozdílné aktivity C/EBP β , jež by mohla stát za rozdílnou expresí CD200R. Studie provedená Dentesantem přináší poznatek, že aktivita C/EBP β inhibuje expresi CD200R na aktivovaných mikrogliích, které jsou vlastně rezidentními makrofágy v centrální nervové soustavě. Tento protein, je-li aktivní, je pak zodpovědný za správnou granulocytopoézu a zrání neutrofilů, naopak u monocytů inhibuje jejich proliferaci. Exprese tohoto transkripčního faktoru se zvyšuje v zánětlivém prostředí, pod vlivem IL-1 β , LPS, TNF α aj. (499). Pokud bychom tedy generalizovali a vzali možnost, že zvýšená aktivita C/EBP β snižuje expresi CD200R i u dalších buněk imunitního systému, byla by v tomto ohledu odpovídající granulocytární populace, neboť C/EBP β podporuje i granulocytopoézu, což by odpovídalo zvýšení počtu neutrofilů a neměnné, či dokonce snížené intenzitě exprese CD200R. Monocytární populace, změny, které nastaly v námi sledovaném období, by tak Dentesantovým výsledkům nevyhovovala, ale je v souladu se studiemi

potvrzujícími nárůst exprese CD200R v prozánětlivém prostředí (500–503). Udržení exprese CD200R na monocytech, navzdory možnému působení C/EBP β , by pak mohla být i pod vlivem aktivace receptoru PPAR γ . Exprese tohoto receptoru se zvyšuje v prozánětlivém prostředí pod vlivem TNF α a IL-4 a má schopnosti tlumit imunitní odpověď. Jedna ze studií dokládá, že právě stimulace tohoto receptoru vede k udržení exprese CD200R a CD200 na mikrogliích v centrální nervové soustavě (504–507).

Možnost, proč u granulocytární populace dochází dokonce k poklesu exprese, může reflektovat zvýšenou koncentraci plazmatického solubilního sCD200R. Vzhledem k tomu, že pouze u subpopulace granulocytů CD200R⁺CD95⁺ dochází k poklesu exprese, je možné se domnívat, že je to právě tato populace, která je zdrojem tohoto volného receptoru. První hodnoty poklesu exprese CD200R kopírují nárůst koncentrace sCD200R. Podobně jako je tomu u jiných solubilních receptorů, má i sCD200R antagonistickou povahu, což je dáno jeho vazbou na molekuly CD200, jimž tak zamezí vázat se na membránově vázané receptory a aktivovat je. I v tomto případě ovšem narážíme na nedostatek jiných pramenů, které by tento jev popisovaly. Jsou dostupné pouze studie týkající se kostního metabolismu, kdy u na lůžko upoutaných účastníků experimentu dochází ke zvýšení koncentrace sCD200R ve spojení se ztrátou kostní tkáně (508).

Co se týká vztahu molekul CD200R a CD95 je možné, že jejich protizánětlivé působení se „sčítá“. Dle všeho CD95 mediovanou apoptózu může zastavit aktivace signálních drah, které aktivují ERK, PI3K, MAPK a NF- κ B (509). Stimulace CD200R inhibuje zmíněné komponenty signálních cest, když aktivuje RasGAP, čímž snižuje po stimulaci CD95 riziko aktivace těch drah, které vedou u buněk ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů (510). Vyřazuje tedy ze hry jeden mechanismus, který by mohl zastavit apoptotický proces. Je tedy možné, že koexprese obou molekul pomáhá udržet náchylnost k apoptóze.

Podíváme-li se i na expresi dalších molekul, abychom získali širší obraz, odhaluje se, že monocyty jsou v pooperačním období spíše tlumené i tlumivé, klesá u nich exprese HLA, CD40, i kostimulačních molekul CD80, CD86, naproti tomu roste exprese CD95, CD200R, CD163 (454, 469, 511). U neutrofilů se pak setkáváme s poklesem CD200R, CD95, naopak roste exprese CD166 a CD195, jež jsou zodpovědné za migraci a chemoatrakci těchto buněk do místa postižení (507). Možnost migrace společně se snížením citlivosti k apoptóze dává neutrofilů prozánětlivý potenciál (454).

Snažili jsme se též zhodnotit, zda síla změn exprese jednotlivých námi měřených molekul koreluje s tíží pooperačního stavu pacientů, tj. zda pacienti s prokázanými

pooperačními komplikacemi vykazují výrazně vyšší či nižší expresi CD200R, CD95, CD95L či koncentraci sérového sCD200R. Tato korelace se nám však nepodařila zachytit. Nemůžeme ani vyjít z jiných studií či porovnat naše výsledky s jinými autory, neboť exprese těchto molekul u kardiochirurgických pacientů není v literatuře popsána. (Je sice možné vypožorovat výraznější dynamiku změn u pacientů, u nichž dojde ke komplikacím, tyto však nemají jednotný vzorec na testovaných buněčných populacích a v měřených znacích. Např. u pacienta s kardiogenním šokem došlo k nárůstu MFI CD200R na granulocytech CD200R⁺CD95⁺ z 44,27 na pooperační hodnotu 293,56, 3. den poklesla na 68,54 /data v textu neuvedena/.)

9. Závěr a zhodnocení přínosu studie a možnosti dalších kroků

V naší studii se nám podařilo potvrdit, že kardiochirurgický zákrok komplexně ovlivňuje buňky imunitního systému patřící do jeho nespecifické složky. U granulocytů i monocytů se v jeho důsledku mění exprese, ať už stoupá, nebo klesá, CD200R, CD95, CD95L a také dochází ke změně koncentrace sCD200R v séru, zde byl zachycen pouze nárůst. Tento jev je patrný u všech pacientů, kteří byli do studie zavzati. Je tedy možné říci, že změny exprese odráží reakci imunitního systému na stresovou zátěž, jakou kardiochirurgická operace beze sporu je, ale není možné je využít jako prediktivního markeru pro stanovení tíže či síly odpovědi imunitního systému a odvodit z nich pooperační vývoj a možné zánětlivé komplikace u pacientů, neboť jejich zvýšení či snížení v naší studii nekoreluje s klinickým stavem pacientů.

Námi zachycené změny mají bezpochyby regulační a stejně tak i kompenzační charakter. Přesné zapojení a dopad na reakci imunitního systému v operačním a pooperačním období je však ovlivněn mnoha dalšími parametry. Tato studie je tak dalším střípkem do mozaiky reakcí organismu na operační zátěž, jež je velmi složitá, komplexní a jedinečná pro každého pacienta, byť základní mechanismy zůstávají shodné.

Ačkoli jsou molekuly CD200R a CD95 v zájmu mnoha výzkumných skupin, je minimum vědeckých kolektivů, v případě CD200R žádný, které by se jimi zabývaly v souvislosti s prováděnými kardiochirurgickými zákroky. Usadíme-li tuto studii do kontextu

ostatních studií týkajících se změn expresí různých povrchových molekul, které dlouhodobě sledujeme, získáváme tak velmi široký pohled na problematiku aktivace či tlumení imunitního systému, jež se odvíjí od kardiochirurgického zákroku. V průběhu let získaná data by tak mohl najít své uplatnění i v klinické praxi. Stát se možnými prediktory stavu pacienta v pooperačním období. Možnost zachytit rozvíjející se zánětlivý stav v jeho počátcích a lépe jej tak řešit a předejít možným komplikacím, či dokonce úmrtí. Dalšími možnými kroky po této prezentované studii by pak mohlo být srovnání změn exprese molekul u různých typů operací, tj. off-pump, miniinvazivní operaci, větší homogenizaci skupiny pacientů. Zde se však naráží na počty pacientů a klinické indikace k daným typům operací, které plně náleží do rukou chirurgů, či připojit do zkoumání též expresi molekuly CD200. Ovšem je otázkou, zda by, vlivem široké distribuce a expresi na mnoha typech tělních buněk, změny její exprese byly dostatečně vypovídající.

Limitace studie již byla nastíněna výše. Jedná se hlavně o počet pacientů, heterogenita souboru pacientů a preoperačních parametrů, tj. pohlaví, věk, komorbidita i indikace k operacím. Je možné též uvažovat o vlivu změny chirurgů provádějících operace.

Vzhledem k tomu, že podobné studie zcela chybí, je i přes své limitace tato studie důležitou a přináší zajímavé a dále využitelné výsledky a poznatky.

Dedikace: dizertační práce byla podpořena projekty **UK PRVOUK P37/10, PROGRES Q40, SVV**.

10. Literatura

1. Lonský V, Žáček P, Dominik J, Kubíček J. Mimotělní oběh v současné klinické praxi, *Kardioforum*, 2005, č.2, s.39-43.
2. Ghorbel MT, Cherif M, Mokhtari A, Bruno VD, Caputo M, Angelini GD. Off-pump coronary artery bypass surgery is associated with fewer gene expression changes in the human myocardium in comparison with on-pump surgery. *Physiol Genomics*. 2010;42(1):67-75.
3. Aydin NB, Gercekoglu H, Aksu B, Ozkul V, Sener T, Kiygil I, Turkoglu T, Cimen S, Babacan F, Demirtas M. Endotoxemia in coronary artery bypass surgery: A comparison of the off-pump technique and conventional cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;125(4):843-8.
4. Okubo N, Hatori N, Ochi M, Tanaka S. Comparison of m-RNA expression for inflammatory mediators in leukocytes between on-pump and off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;9(1):43-9.
5. El Azab SR, Doha N, Rady A, El-Sayed AE, Abd-Rabo M. The cytokine balance during CABG surgery with and without cardiopulmonary bypass. *Egyptian Journal of Anaesthesia*. 2010;26(4):281-286.
6. Karu I, Taal G, Zilmer K, Pruunsild C, Starkopf J, Zilmer M. Inflammatory/oxidative stress during the first week after different types of cardiac surgery. *Scand Cardiovasc J*. 2010;44(2):119-24.
7. Valletly MP, Bannon PG, Bayfield MS, Hughes CF, Kritharides L. Endothelial activation after coronary artery bypass surgery: Comparison between on-pump and off-pump techniques. *Heart Lung Circ*. 2010;19:445-452.
8. Rimmelé T, Venkataraman R, Madden NJ, Elder MM, Wei LM, Pellegrini RV, Kellum JA. Comparison of inflammatory response during on-pump and off-pump coronary artery bypass surgery. *Int J Artif Organs*. 2010;33(3):131-8.
9. Vohra HA, Whistance R, Modi A, Ohri SK. The Inflammatory Response to Miniaturised Extracorporeal Circulation: A Review of the Literature. *Mediators of Inflammation*. 2009;2009:707042.
10. Anastasiadis K, Antonitsis P, Haidich AB, Argiriadou H, Deliopoulos A, Papakonstantinou C. Use of minimal extracorporeal circulation improves outcome after heart

Sumery; a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol.* 2013;164(2):158-69.

11. Formica F, Broccolo F, Martino A, Sciucchetti J, Giordano V, Avalli L, Radaelli G, Ferro O, Corti F, Cocuzza C, Paolini G. Myocardial revascularization with miniaturized extracorporeal circulation versus off pump: Evaluation of systemic and myocardial inflammatory response in a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;137(5):1206-12.

12. Donndorf P, Kühn F, Vollmar B, Rösner J, Liebold A, Gierer P, Steinhoff G, Kaminski A. Comparing microvascular alterations during minimal extracorporeal circulation and conventional cardiopulmonary bypass in coronary artery bypass graft surgery: a prospective, randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;144(3):677-83.

13. Edelman JJ, Fung YL, Pennings GJ, Reddel CJ, Bannon PG, Bayfield MS, Kritharides L, Fraser JF, Vallely MP. Off-pump coronary artery bypass surgery induces prolonged alterations to host neutrophil physiology. *Shock.* 2013;39(2):149-54.

14. Taniguchi T, Yamamoto K. Anti-inflammatory effects of intravenous anesthetics on endotoxemia. *Mini Rev Med Chem.* 2005;5(3):241-5.

15. Kawamura T, Kadosaki M, Nara N, Kaise A, Suzuki H, Endo S, Wei J, Inada K. Effects of sevoflurane on cytokine balance in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2006;20(4):503-8.

16. Garcia C, Julier K, Bestmann L, Zollinger A, von Segesser LK, Pasch T, Spahn DR, Zaugg M. Preconditioning with sevoflurane decreases PECAM-1 expression and improves one-year cardiovascular outcome in coronary artery bypass graft surgery. *Br J Anaesth.* 2005;94(2):159-65.

17. Corcoran TB, Engel A, Sakamoto H, O'Callaghan-Enright S, O'Donnell A, Heffron JA, Shorten G. The effects of propofol on lipid peroxidation and inflammatory response in elective coronary artery bypass grafting. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2004;18(5):592-604.

18. Sobieski MA 2nd, Graham JD, Pappas PS, Tatroles AJ, Slaughter MS. Reducing the effects of the systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: Can single dose steroids blunt systemic inflammatory response syndrome? *ASAIO J.* 2008;54(2):203-6.

19. Dieleman JM, van Paassen J, van Dijk D, Arbous MS, Kalkman CJ, Vandenbroucke JP, van der Heijden GJ, Dekkers OM. Prophylactic corticosteroids for cardiopulmonary bypass in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;(5):CD005566.

20. Maruna P, Klein AA, Kunstýř J, Plocová KM, Mlejnský F, Lindner J. Aprotinin reduces the procalcitonin rise associated with complex cardiac surgery and cardiopulmonary bypass. *Physiol Res*. 2013;62(1):27-33.
21. Berg K, Langaas M, Ericsson M, Pleym H, Basu S, Nordrum IS, Vitale N, Haaverstad R. Acetylsalicylic acid treatment until surgery reduces oxidative stress and inflammation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2013;43(6):1154-63.
22. Ng CS, Wan S. Limiting inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pharmaceutical strategies. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(2):155-9.
23. Berger MM, Delodder F, Liaudet L, Tozzi P, Schlaepfer J, Chiolerio RL, Tappy L. Three short perioperative infusions of n-3 PUFAs reduce systemic inflammation induced by cardiopulmonary bypass surgery: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2013;97(2):246-54.
24. Oerlemans MI, Liu J, Arslan F, den Ouden K, van Middelaar BJ, Doevendans PA, Sluijter JP. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(4):270.
25. Montecucco F, Lenglet S, Braunersreuther V, Pelli G, Pellieux C, Montessuit C, Lerch R, Deruaz M, Proudfoot AE, Mach F. Single administration of the CXC chemokine-binding protein Evasin-3 during ischemia prevents myocardial reperfusion injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(7):1371-7.
26. Raja SG, Dreyfus GD. Modulation of systemic inflammatory response after cardiac surgery. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2005;13(4):382-95.
27. Santarpino G, Caroleo S, Onorati F, Rubino AS, Dardano A, Gulletta E, Santangelo E, Amantea B, Renzulli A. Inflammatory response after cardiopulmonary bypass: a randomized comparison between conventional hemofiltration and steroids. *Cardiovasc* 23:175-182, 2008) *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2009;50(4):555-64.
28. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. *Injury*. 2007;38(12):1336-45.
29. Weledji EP. Cytokines and the Metabolic Response to Surgery. *J Clin Cell Immunol*. 2014;5:197.
30. Kallel S, Jmel W, Jarraya A, Abdenadher M, Frikha I, Karouia A. The role of procalcitonin and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in predicting outcome after cardiac surgery. *Perfusion*. 2012;27(6):504-11.

31. Kerbaul F, Giorgi R, Oddoze C, Collart F, Guidon C, Lejeune PJ, Villacorta J, Gouin F. High concentrations of N-BNP are related to non-infectious severe SIRS associated with cardiovascular dysfunction occurring after off-pump coronary artery surgery. *Br J Anaesth.* 2004;93(5):639-44.
32. Kelley KW, Weigent DA, Kooijman R. Protein Hormones and Immunity. *Brain Behav Immun.* 2007;21(4):384–392.
33. Elenkov IJ. Neurohormonal-cytokine interactions: implications for inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochem Int.* 2008;52(1-2):40-51.
34. Vida G, Peña G, Kanashiro A, Thompson-Bonilla Mdel R, Palange D, Deitch EA, Ulloa L. β 2-Adrenoreceptors of regulatory lymphocytes are essential for vagal neuromodulation of the innate immune system. *FASEB J.* 2011;25(12):4476-85.
35. Grisanti LA, Evanson J, Marchus E, Jorissen H, Woster AP, DeKrey W, Sauter ER, Combs CK, Porter JE. Pro-Inflammatory Responses in Human Monocytes are β 1-Adrenergic Receptor Subtype Dependent. *Mol Immunol.* 2010;47(6):1244-1254.
36. Borovikova LV, Ivanova S, Nardi D, Zhang M, Yang H, Ombrellino M, Tracey KJ. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Auton Neurosci.* 2000;85:141-7.
37. Altavilla D, Guarini S, Bitto A, Mioni C, Giuliani D, Bigiani A, Squadrito G, Minutoli L, Venuti FS, Messineo F, De Meo V, Bazzani C, Squadrito F. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway reduces NF-kappaB activation, blunts TNF-alpha production, and protects against splanchnic artery occlusion shock. *Shock.* 2006;25:500-6.
38. Øvrum E, Tangen G, Tølløfsrud S, Øystese R, Ringdal MA, Istad R. Cold blood versus cold crystalloid cardioplegia: a prospective randomised study of 345 aortic valve patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010;38(6):745-9.
39. Podesser BK, Hallström S. Nitric oxide homeostasis as a target for drug additives to cardioplegia. *Br J Pharmacol.* 2007;151(7):930-940.
40. Olivencia-Yurvati AH, Blair JL, Baig M, Mallet RT. Pyruvate-enhanced cardioprotection during surgery with cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2003;17:715-720.
41. Suleiman MS, Zacharowski K, Angelini GD. Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery: the importance of anaesthetics. *Br J Pharmacol.* 2008;153(1):21-33.

42. Uyar I, Mansuroglu D, Kirali K, Erentug V, Bozbuga NU, Uysal G, Yakut C. Aspartate and glutamate-enriched cardioplegia in left ventricular dysfunction. *J Card Surg.* 2005;20:337-344.
43. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol.* 2005;14(4):170-5.
44. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(5):H1723-41.
45. Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Rationale for Therapy. *Am J Cardiol.* 2010;106(3):360-368.
46. Marban E, Koretsune Y, Kusuoka H. Disruption of intracellular Ca^{2+} homeostasis in hearts reperfused after prolonged episodes of ischemia. *Ann NY Acad Sci.* 723: 38-50, 1994.
47. Feissner RF, Skalska J, Gaum WE, Sheu SS. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS. *Front Biosci.* 2009;14:1197-218.
48. Skyschally A, van Caster P, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, Schulz R, Heusch G. Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res.* 2009;104:15-18.
49. Schäfer C, Ladilov Y, Inserte J, Schäfer M, Haffner S, Garcia-Dorado D, Piper HM. Role of the reverse mode of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res.* 2001;51:241-250.
50. Fischer M, Mlček M, Konvičková S, Kittnar O. Matematický model elektromechanického srdečního kontraktilního aparátu - elektronické “k.o.” $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ výměníku. *Bulletin of Applied Mechanics.* 2007;3(10),63-71.
51. Osada M, Netticadan T, Tamura K, Dhalla NS. Modification of ischemia-reperfusion-induced changes in cardiac sarcoplasmic reticulum by preconditioning. *Am J Physiol.* 1998;274(6 Pt 2):H2025-34.
52. Rodríguez-Sinovas A, Abdallah Y, Piper HM, Garcia-Dorado D. Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction. *Heart Fail Rev.* 207;12: 207-216.
53. Kawamura T, Wakusawa R, Okada K, Inada S. Elevation of cytokines during open heart surgery with cardiopulmonary bypass: participation of interleukin 8 and 6 in reperfusion injury. *Can J Anaesth.* 1993;40(11):1016-21.

54. Wildhirt SM, Weismueller S, Schulze C, Conrad N, Kornberg A, Reichart B. Inducible nitric oxide synthase activation after ischemia/reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extent of infarct size in rabbits: evidence for a late phase of nitric oxide-mediated reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1999;43(3):698-711.
55. Xiao CY, Hara A, Yuhki K, Fujino T, Ma H, Okada Y, Takahata O, Yamada T, Murata T, Narumiya S, Ushikubi F. Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia-reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors. *Circulation.* 2001;104(18):2210-5.
56. Sivaraman V, Hausenloy DJ, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Lawrence D, Di Salvo C, Yellon DM. The divergent roles of protein kinase C epsilon and delta in simulated ischaemia-reperfusion injury in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46(5):758-64.
57. Sanada S, Asanuma H, Tsukamoto O, Minamino T, Node K, Takashima S, Fukushima T, Ogai A, Shinozaki Y, Fujita M, Hirata A, Okuda H, Shimokawa H, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C. *Circulation.* 2004;110(1):51-7.
58. Reffelmann T, Kloner RA. The "no-reflow" phenomenon: basic science and clinical correlates. *Heart.* 2002;87:162-8.
59. Zhang M, Hou Y, Gulaya K, Lee D, Lee J, Rushbrook J, Ko W, Shevde K. Early complement activation through alternative pathway significantly correlates to myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery. *J Immunology.* 2010;184:142.6
60. Niels C, Riedemann and Peter A. Ward. Complement in Ischemia Reperfusion Injury. *Am J Pathol.* 2003;162(2):363-367.
61. Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Hoeven J Mol Immunol.* 2007;44(1-3):82-94.
62. Collard CD, Bukusoglu C, Agah A, Colgan SP, Reenstra WR, Morgan BP, Stahl GL. Hypoxia-induced expression of complement receptor type 1 (CR1, CD35) in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 1992;276(2 Pt 1):C450-8.
63. Kimura Y, Inoue N, Fukui A, Oshiumi H, Matsumoto M, Nonaka M, Kuratani S, Fujita T, Nonaka M, Seya T. A short consensus repeat-containing complement regulatory protein of lamprey that participates in cleavage of lamprey complement 3. *J Immunol.* 2004;173(2):1118-28.

64. Huang Y, Fedarovich A, Tomlinson S, Davies C. Crystal structure of CD59: implications for molecular recognition of the complement proteins C8 and C9 in the membrane-attack complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2007;63(Pt 6):714-21.
65. Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system? *Mol Immunol*. 2004;40(18):1333-46.
66. Cazander G, N. Jukema GN, Peter H. Nibbering PH. Complement Activation and Inhibition in Wound Healing. *Clinical and Developmental Immunology*. Volume 2012 (2012), Article ID 534291, 14 pages.
67. Miles LA, Lighvani S, Baik N, Andronicos NM, Chen EI, Parmer CM, Khaldoyanidi S, Diggs JE, Kiosses WB, Kamps MP, Yates JR 3rd, Parmer RJ. The plasminogen receptor, PlgR(KT), and macrophage function. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:250464.
68. Yayama K, Kunimatsu N, Teranishi Y, Takano M, Okamoto H. Tissue kallikrein is synthesized and secreted by human vascular endothelial cells *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003;1593(2-3):231-238.
69. Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, Leyen T, van Het Hof B, Couraud PO, Vivien D, Dijkstra CD, de Vries HE. Tissue-type plasminogen activator is a regulator of monocyte diapedesis through the brain endothelial barrier. *J Immunol*. 2008;181(5):3567-74.
70. Flick MJ, Du X, Witte DP, Jirousková M, Soloviev DA, Busuttil SJ, Plow EF, Degen JL. Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor α M β 2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo. *J Clin Invest*. 2004;113(11):1596-606.
71. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komáromi I, Katona É. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev*. 2011;91(3):931-72.
72. Gorbet MB, Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 2004;25(26):5681-703.
73. Esmon CT, Xu J, Lupu F. Innate immunity and coagulation. *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl 1:182-8.
74. Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M. Interaction Between the Coagulation and Complement System. *Adv Exp Med Biol*. 2008;632:71-9.
75. Hoel TN, Videm V, Mollnes TE, Saatvedt K, Brosstad F, Fiane AE, Fosse E, Svennevig JL. Off-pump cardiac surgery abolishes complement activation. *Perfusion*. 2007;22(4):251-6.

76. Hoedemaekers C, van Deuren M, Sprong T, Pickkers P, Mollnes TE, Klasen I, van der Hoeven J. The complement system is activated in a biphasic pattern after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg.* 2010;89(3):710-6.
77. Sahu A, Lambris JD. Complement inhibitors: a resurgent concept in anti-inflammatory therapeutics. *Immunopharmacology.* 2000;49(1-2):133-48.
78. Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, Pasini E, Comini L, Curello S, Ferrari R, Knight R, Latchman D. Apoptosis of Endothelial Cells Precedes Myocyte Cell Apoptosis in Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation.* 2001;104(3):253-6.
79. Banfi C, Brioschi M, Wait R, Begum S, Gianazza E, Pirillo A, Mussoni L, Tremoli E. Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles. *Proteomics.* 2005;5(17):4443-55.
80. Yang D, Xie P, Liu Z. Ischemia/Reperfusion-Induced MKP-3 Impairs Endothelial NO Formation via Inactivation of ERK1/2 Pathway. *PLoS ONE* 2012;7(7):e42076.
81. Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, Jones ML, Johnson KJ, Glovsky MM, Eddy SM, Ward PA. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest.* 1994;94(3):1147-55.
82. Zweier JL, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Klunk D, Luty GA. Measurement and characterization of free radical generation in reoxygenated human endothelial cells *Am J Physiol.* 1994;266(3 Pt 1):C700-8.
83. Pinsky DJ, Naka Y, Liao H, Oz MC, Wagner DD, Mayadas TN, Johnson RC, Hynes RO, Heath M, Lawson CA, Stern DM. Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. *J Clin Invest.* 1996;97(2):493-500.
84. Wang S, Dangerfield JP, Young RE, Nourshargh S. PECAM-1, alpha6 integrins and neutrophil elastase cooperate in mediating neutrophil transmigration. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 9):2067-76.
85. Ginzberg HH, Cherapanov V, Dong Q, Cantin A, McCulloch CA, Shannon PT, Downey GP. Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(3):G705-17.
86. Zhao RZ, Chen X, Yao Q, Chen C. TNF-alpha induces interleukin-8 and endothelin-1 expression in human endothelial cells with different redox pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;327(4):985-92.

87. F Cozzolino, M Torcia, D Aldinucci, M Ziche, F Almerigogna, D Bani, D M Stern. Interleukin 1 is an autocrine regulator of human endothelial cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(17):6487-6491.
88. Beauloye C, Bertrand L, Krause U, Marsin AS, Dresselaers T, Vanstapel F, Vanoverschelde JL, Hue L. No-flow ischemia inhibits insulin signaling in heart by decreasing intracellular pH. *Circ Res*. 2001;88:513-9.
89. Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev*. 2003;83:59-115.
90. Hedayat M, Mahmoudi MJ, Rose NR, Rezaei N. Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. *Heart Fail Rev*. 2010;15(6):543-62.
91. Atefi G, Zetoune FS, Herron TJ, Jalife J, Bosmann M, Al-Aref R, Sarma JV, Ward PA. Complement dependency of cardiomyocyte release of mediators during sepsis. *FASEB J*. 2011;25(7):2500-8.
92. Säemann MD, Haidinger M, Hecking M, Hörl WH, Weichhart T. The multifunctional role of mTOR in innate immunity: implications for transplant immunity. *Am J Transplant*. 2009;9(12):2655-61.
93. Aoyagi T, Matsui T. The cardiomyocyte as a source of cytokine in cardiac injury. *J Cell Sci Ther*. 201;2012(0):003.
94. Roberta A. Gottlieb, MD. Cell Death Pathways in Acute Ischemia/Reperfusion Injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011;16(3-4):233-8.
95. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(4):359-65.
96. Pugin J. How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Ann Intensive Care*. 2012;2(1):27.
97. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, Horwood N, Nanchahal J. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2711-2719.
98. Manson J, Thiernemann C, Brohi K. Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation. *Br J Surg*. 2012;99 Suppl 1:12-20.
99. Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol*. 2007;149(2):217-25.
100. Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J, Sponheim J, Küchler AM. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol*. 2009;30(5):227-33.

101. Simon DI, Zidar D. Neutrophils in atherosclerosis: alarmin evidence of a hit and run? *Circ Res.* 2012;110(8):1036-8.
102. Qin C, Gu J, Hu J, Hong Qian, Xu Fei, Yajiao Li, Ruiqi Liu, Wei Meng. Platelets activation is associated with elevated plasma mitochondrial DNA during cardiopulmonary bypass. *Journal of Cardiothoracic Surgery.* 2016;11:90. doi:10.1186/s13019-016-0481-4.
103. Qin C, Liu R, Gu J, Li Y, Qian H, Shi Y, Meng W. Variation of perioperative plasma mitochondrial DNA correlate with peak inflammatory cytokines caused by cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Surg.* 2015 Jun 24;10:85.
104. Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn DP. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res.* 2012;94(2):276-83.
105. McGuinness J, Bouchier-Hayes D, Redmond JM. Understanding the inflammatory response to cardiac surgery. *Surgeon.* 2008;6(3):162-71.
106. Börgermann J, Friedrich I, Flohé S, Spillner J, Majetschak M, Kuss O, Sablotzki A, Feldt T, Reidemeister JC, Schade FU. Tumor necrosis factor-alpha production in whole blood after cardiopulmonary bypass: downregulation caused by circulating cytokine-inhibitory activities. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;124(3):608-17.
107. O'Nualláin EM, Puri P, Mealy K, Reen DJ. Induction of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) following surgery is associated with major trauma. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995;76(1 Pt 1):96-101.
108. Dreyer WJ, Phillips SC, Lindsey ML, Jackson P, Bowles NE, Michael LH, Jackson P, Bowles NE, Michael LH, Entman ML. Interleukin 6 induction in the canine myocardium after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;120:256-263.
109. Sander M, von Heymann C, von Dossow V, Spaethe C, Konertz WF, Jain U, Spies CD. Increased interleukin-6 after cardiac surgery predicts infection. *Anesth Analg.* 2006;102(6):1623-9.
110. Wan S, Yim APC. Cytokines in myocardial injury: impact on cardiac surgical approach. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999;16:S107-S111.
111. Franke A, Lante W, Kollig E, Koeller M, Schinkel C, Markewitz A. Exogenous IL-12 and its effect on TH1/TH2 cell activity after cardiac surgery. *Shock.* 2009;32(4):366-73.
112. Franke A, Lante W, Kurig E, Zöller LG, Weinhold C, Markewitz A. Is interferon gamma suppression after cardiac surgery caused by a decreased interleukin-12 synthesis? *Ann Thorac Surg.* 2006;82(1):103-9.

113. Yadavalli GK, Wener K, Lee J, Salata RA, Heinzl FP. Postoperative INF γ synthetic capacity is impaired after on-pump cardiac surgery, but is preserved after off-pump surgery in younger individuals. *Chest*. 2003;124:103S-a-103S.
114. Jankovicova K, Kolackova M, Kunes P, Holubcova Z, Krejsek J, Mandak J. Interferon gamma receptor expression on granulocytes of cardiac surgical patients is modulated differently by the type of cardiopulmonary bypass used. *Perfusion*. 2012;27(1):49-55.
115. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*. 2000;127(2):117-26.
116. Stahl GL, Shernan SK, Smith PK, Levy JH. Complement Activation and Cardiac Surgery: A Novel Target for Improving Outcomes. *Anesthesia and analgesia*. 2012;115(4):759-771.
117. Balciūnas M, Bagdonaite L, Samalavicius R, Baublys A. Markers of endothelial dysfunction after cardiac surgery: soluble forms of vascular-1 and intercellular-1 adhesion molecules. *Medicina (Kaunas)*. 2009;45(6):434-9.
118. Bitkover CY, Hansson LO, Valen G, Vaage J. Effects of cardiac surgery on some clinically used inflammation markers and procalcitonin. *Scand Cardiovasc J*. 2000;34(3):307-14.
119. Bernhard M, Schultz KM, Hofer S, Hainer C, Gegouskov V, Martin E, Karck M, Motsch J, Weigand MA, Luntz SP, Lichtenstern C. MIF and markers of the inflammatory response following cardiac surgery under extracorporeal circulation. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology*. 2010;14:115-123.
120. Ağırbaşı M, Nguyen ML, Win K, Kunselman AR, Clark JB, Myers JL, Undar A. Inflammatory and hemostatic response to cardiopulmonary bypass in pediatric population: feasibility of seriological testing of multiple biomarkers. *Artif Organs*. 2010;34(11):987-95.
121. Gould JM, Weiser JN. Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. *Infect Immun*. 2001;69:1747-54.
122. Semple SJ. C-reactive protein - biological functions, cardiovascular disease and physical exercise. *South African Journal of Sports Medicine*. 2006;18(1):24.
123. Corral L, Carrió ML, Ventura JL, Torrado H, Javierre C, Rodriguez-Castro D, Farrero E, Valero J, Ortiz D. Is C-reactive protein a biomarker for immediate clinical outcome after cardiac surgery? *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2009;23(2):166-9.

124. Balciunas M, Bagdonaite L, Samalavicius R, Griskevicius L, Vuylsteke A. Pre-operative high sensitive C-reactive protein predicts cardiovascular events after coronary artery bypass grafting surgery: A prospective observational study. *Ann Card Anaesth.* 2009;12(2):127-32.
125. Inforzato A, Peri G, Doni A, Garlanda C, Mantovani A, Bastone A, Carpentieri A, Amoresano A, Pucci P, Roos A, Daha MR, Vincenti S, Gallo G, Carminati P, De Santis R, Salvatori G. Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation. *Biochemistry.* 2006;45(38):11540-51.
126. Braunschweig A, Józsi M. Human pentraxin 3 binds to the complement regulator c4b-binding protein. *PLoS One.* 2011;6(8):e23991.
127. Doni A, Garlanda C, Bottazzi B, Meri S, Garred P, Mantovani A. Interactions of the humoral pattern recognition molecule PTX3 with the complement system. *Immunobiology.* 2012;217(11):1122-8.
128. Inoue K, Kodama T, Daida H. Pentraxin 3: A Novel Biomarker for Inflammatory Cardiovascular Disease. *Int J Vasc Med.* 2012;2012:657025.
129. Salio M, Chimenti S, De Angelis N, Molla F, Maina V, Nebuloni M, Pasqualini F, Latini R, Garlanda C, Mantovani A. Cardioprotective Function of the Long Pentraxin PTX3 in Acute Myocardial Infarction. *Circulation.* 2008;117(8):1055-64.
130. Kunes P, Holubcova Z, Kolackova M, Krejsek J. Pentraxin 3(PTX 3): An Endogenous Modulator of the Inflammatory Response. *Mediators of Inflammation.* 2012:920517.
131. Kunes P, Lonsky V, Mandak J, Kolackova M, Andrys C, Kudlova M, Krejsek J. The long pentraxin 3 in cardiac surgery: distinct responses in "on-pump" and "off-pump" patients. *Scand Cardiovasc J.* 2007;41(3):171-9.
132. Kallel S, Abid M, Jarraya A, Abdenadher M, Mnif E, Frikha I, Ayadi F, Karoui A. Kinetics, diagnostic and prognostic value of procalcitonin after cardiac surgery. *Ann Biol Clin.* 2012;70(5):567-80.
133. Guenzinger R, Lahm H, Wottke M, Lange R. Role of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during cardiopulmonary bypass in rats. *ASAIO J.* 2012;58(3):204-11.
134. Lalu MM, Pasini E, Schulze CJ, Ferrari-Vivaldi M, Ferrari-Vivaldi G, Bachetti T, Schulz R. Ischaemia-reperfusion injury activates matrix metalloproteinases in the human heart. *Eur Heart J.* 2005;26(1):27-35.

135. Popov D, Plyushch M, Ovseenko S, Abramyan M, Podshchekoldina O, Yaroustovsky M. Prognostic value of sCD14-ST (presepsin) in cardiac surgery. *Kardiochir Torakochirurgia Pol.* 2015;12(1):30-6.
136. Bomberg H, Klingele M, Wagenpfeil S, Spanuth E, Volk T, Sessler DI, Schäfers HJ, Groesdonk HV. Presepsin (sCD14-ST) is a novel marker for risk stratification in cardiac surgery patients. *Anesthesiology.* 2017;126(4):631-642.
137. De Prost N, El-Karak C, Avila M, Ichinose F, Vidal Melo MF. Changes in cysteinyl leukotrienes during and after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in patients with and without chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 2011;141(6):1496-502.e3.
138. Pearl JM, MD, Manning PB, MD, McNamara JL, Saucier MM, Thomas DW. Effect of modified ultrafiltration on plasma thromboxane B₂, leukotriene B₄, and endothelin-1 in infants undergoing cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1999;68:1369–75.
139. Sakata Y, Dong JW, Vallejo JG, Huang CH, Baker JS, Tracey KJ, Tacheuchi O, Akira S, Mann DL. Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(1):H503-9.
140. Krejsek J, Kolácková M, Mand'ák J, Kunes P, Holubcová Z, Holmannová D, AbuAttieh M, Andrýs C. TLR2 and TLR4 expression on blood monocytes and granulocytes of cardiac surgical patients is not affected by the use of cardiopulmonary bypass. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2013;56(2):57-66.
141. Golovkin AS, Matveeva VG, Kudryavtsev IV, Chernova MN, Bayrakova YV, Shukevich DL, Grigoriev EV. Perioperative dynamics of TLR2, TLR4, and TREM-1 expression in monocyte subpopulations in the setting of on-pump coronary artery bypass surgery. *ISRN Inflamm.* 2013;2013:817901.
142. Hadley JS, Wang JE, Michaels LC, Dempsey CM, Foster SJ, Thiemermann C, Hinds CJ. Alterations in inflammatory capacity and TLR expression on monocytes and neutrophils after cardiopulmonary bypass. *Shock.* 2007;27(5):466-73.
143. Krejsek J, Kunes P, Kolackova M, Kudlova M, Lonsky V, Mandak J, Andrys C. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 on innate immunity cells modulated by cardiac surgical operation. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008;68(8):749-58.
144. Kurosawa S, Wagatsuma T, Saito K, Toyama H, Kato M. Different Regulation of Toll-Like Receptors in CD14+ Cells in Patients Undergoing Cardiac Surgery. *Anesthesiology* 2007;107:A533

145. Gaddis DE, Maynard CL, Weaver CT, Michalek SM, Katz J. Role of TLR2-dependent IL-10 production in the inhibition of the initial IFN- γ T cell response to *Porphyromonas gingivalis*. *J Leukoc Biol*. 2013;93(1):21-31.
146. Triantafilou M, Manukyan M, Mackie A, Morath S, Hartung T, Heine H, Triantafilou K. Lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 internalization and targeting to the Golgi are lipid raft-dependent. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40882-9.
147. Cha J, Wang Z, Ao L, Zou N, Dinarello CA, Banerjee A, Fullerton DA, Meng X. Cytokines link Toll-like receptor 4 signaling to cardiac dysfunction after global myocardial ischemia. *Ann Thorac Surg*. 2008;85(5):1678-85.
148. Ao L, Zou N, Cleveland JC Jr, Fullerton DA, Meng X. Myocardial TLR4 is a determinant of neutrophil infiltration after global myocardial ischemia: mediating KC and MCP-1 expression induced by extracellular HSC70. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(1):H21-8.
149. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*. 2006;112:358-404.
150. Sitkovsky MV, Ohta A. The "danger" sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol*. 2005;26:299-304.
151. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost*. 2009;101(1):36-47.
152. Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Immunosuppression following surgical and traumatic injury. *Surg Today*. 2010;40(9):793-808.
153. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(1):23-63.
154. Pardali E, ten Dijke P. TGF β Signaling and Cardiovascular Diseases. *Int J Biol Sci*. 2012;8(2):195-213.
155. Kalinski P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin. *J. Immunol*. 2012;188(1):21-8.
156. Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood*. 2009;113(11):2394-401.
157. Chen Y, Guillemin GJ. Kynurenine Pathway Metabolites in Humans: Disease and Healthy States. *Int J Tryptophan Res*. 2009;2:1-19.

158. MacConmara MP, Maung AA, Fujimi S, McKenna AM, Delisle A, Lapchak PH, Rogers S, Lederer JA, Mannick JA. Increased CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. *Ann Surg.* 2006;244(4):514-23.
159. Bover LC, Cardó-Vila M, Kuniyasu A, Sun J, Rangel R, Takeya M, Aggarwal BB, Arap W, Pasqualini R. A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *J Immunol.* 2007;178(12):8183-94.
160. Fabrick BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Schornagel K, Vloet RP, Dijkstra CD, van den Berg TK The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood.* 2009;113(4):887-92.
161. Moestrup SK, Møller HJ. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med.* 2004;36(5):347-54.
162. Kolackova M, Lonsky V, Trojackova Kudlova M, Mandak J, Kunes P, Svitek V, Jankovicova K, Vlaskova D, Andrys C, Krejsek J. Serum level of sCD163, a soluble receptor for hemoglobin, is influenced by cardiac surgery. *Perfusion.* 2009;24(4):263-9.
163. Møller HJ, Nielsen MJ, Maniecki MB, Madsen M, Moestrup SK. Soluble macrophage-derived CD163: a homogenous ectodomain protein with a dissociable haptoglobin-hemoglobin binding. *Immunobiology.* 2010;215(5):406-12.
164. Weaver LK, Pioli PA, Wardwell K, Vogel SN, Guyre PM. Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors. *J Leukoc Biol.* 2007;81(3):663-71.
165. Krejsek J, Mandak J, Kunes P, Lonsky V, Kolackova M, Jankovicova K, Andrys C. Impact of methylprednisolone in priming solution of cardiopulmonary bypass on anti-inflammatory CD163 receptor during cardiac surgery. *Perfusion.* 2012;27(4):284-91.
166. Kolackova M, Lonsky V, Trojackova Kudlova M, Mandak J, Kunes P, Svitek V, Jankovicova K, Vlaskova D, Andrys C, Krejsek J. Serum level of sCD163, a soluble receptor for hemoglobin, is influenced by cardiac surgery. *Perfusion.* 2009;24(4):263-9.
167. Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol.* 2000;67(1):97-103.
168. Rothenburger M, Tjan TD, Schneider M, Berendes E, Schmid C, Wilhelm MJ, Böcker D, Scheld HH, Soeparwata R. The impact of the pro- and anti-inflammatory immune response on ventilation time after cardiac surgery. *Cytometry B Clin Cytom.* 2003;53(1):70-4.

169. Huijbens RJF, Heije K, de Vries JE, Figdor CG. Interleukin4 (IL4) Inhibits Secretion of IL1 β , Tumor Necrosis Factor α , and IL6 by Human Monocytes. *Blood*. 1990;76:1392-1397.
170. Strüber M, Cremer JT, Gohrbandt B, Hagl C, Jankowski M, Völker B, Rückoldt H, Martin M, Haverich A. Human cytokine responses to coronary artery bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1999;68:1330-5.
171. Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Immunosuppression following surgical and traumatic injury. *Surg Today*. 2010;40(9):793-808.
172. Scholl R, Bekker A, Babu R. Neuro and Immune Responses to Surgery. *The Internet Journal of Anesthesiology*. 2012;Vol.30:Nr 3.
173. Menger M, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch Surg*. 2004; 389:475-484.
174. Piro JT, Howdieshell TR, Goddard JK, Callaway DB, Hamilton RG, Mansberger AR Jr. Association of interleukin-4 plasma levels with traumatic injury and clinical course. *Arch Surg*. 1995;130:1159-62.
175. Kolackova M1, Krejsek J, Svitek V, Kunes P, Mandak J, Holubcova Z, Lonsky V. The effect of conventional and mini-invasive cardiopulmonary bypass on neutrophil activation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:152895.
176. Rossaint J, Berger C, Van AH, Scheld HH, Zahn PK, Rukosujew A, Zarbock A. Cardiopulmonary bypass during cardiac surgery modulates systemic inflammation by affecting different steps of the leukocyte recruitment cascade. *PLoS One*. 2012;7(9):e45738.
177. Jankovicová K, Kudlová MT, Kolácková M, Kunes P, Mand'ák J, Lonský V, Vlášková D, Andrýs C, Krejsek J. The effect of cardiac surgery on peripheral blood lymphocyte populations. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2008;51(1):25-9.
178. Ogawa K, Hirai M, Katsube T, Murayama M, Hamaguchi K, Shimakawa T, Naritake Y, Hosokawa T, Kajiwara T. Suppression of cellular immunity by surgical stress. *Surgery*. 2000;127:329-336.
179. Franke A, Lante W, Kollig E, Koeller M, Schinkel C, Markewitz A. Exogenous IL-12 and its effect on TH1/TH2 cell activity after cardiac surgery. *Shock*. 2009;32(4):366-73.
180. Franke A, Lante W, Kurig E, Zöller LG, Weinhold C, Markewitz A. Hyporesponsiveness of T cell subsets after cardiac surgery: a product of altered cell function or merely a result of absolute cell count changes in peripheral blood? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006;30(1):64-71.

181. Ward NS, Casserly B, Ayala A. The Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome (CARS) in Critically ill patients. *Clin Chest Med*. 2008;29(4):617-viii.
182. Bandyopadhyay G, De A, Laudanski K, Li F, Lentz C, Bankey P, Miller-Graziano C. Negative signaling contributes to T-cell anergy in trauma patients. *Crit Care Med*. 2007;35(3):794-801.
183. Gasz B, Lenard L, Benko L, Borsiczky B, Szanto Z, Lantos J, Szabados S, Alotti N, Papp L, Roth E. Expression of CD97 and adhesion molecules on circulating leukocytes in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Eur Surg Res*. 2005;37(5):281-9.
184. Bayer A, Doğan OF, Ersoy F, Ünsal Ersoy. The effect of open heart surgery on circulating lymphocytes and lymphocyte subsets in pediatric patients. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg*. 2009;17(1):13-17.
185. Armstrong M A, Sharma V, Austin C, Kahlil N, Gibson F, McMurray TJ, Graham A, McBride WT. Plasmacytoid dendritic cells are activated at cardiac surgery: O-41. *Eur J Anaesthesiol*. 2006;23-p14.
186. Lante W, Franke A, Weinhold C, Markewitz A. Immunoglobulin levels and lymphocyte subsets following cardiac operations: further evidence for a T-helper cell shifting. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;53(1):16-22.
187. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE Jr, Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, Karl IE. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol*. 2001;166:6952-6963.
188. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204(12):3037-47.
189. Franke A, Lante W, Kollig E, Markewitz A. A comparison of monocyte counts and ex vivo and in vitro monocyte cytokine production after major surgical trauma. *J Surg Res*. 2009;154(1):91-8.
190. Erdoes G, Balmer ML, Slack E, Kocsis I, Lehmann LE, Eberle B, Stüber F, Book M. CD62L (L-selectin) shedding for assessment of perioperative immune sensitivity in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *PLoS One*. 2013;8(1):e53045.

191. Gessler P, Pretre R, Bürki C, Rousson V, Frey B, Nadal D. Monocyte function-associated antigen expression during and after pediatric cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130(1):54-60.
192. Gasz B, Lenard L, Benko L, Borsiczky B, Szanto Z, Lantos J, Szabados S, Alotti N, Papp L, Roth E. Expression of CD97 and adhesion molecules on circulating leukocytes in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Eur Surg Res.* 2005;37(5):281-9.
193. Golovkin S, Matveeva VG, Kudryavtsev IV, Chernova MN, Bayrakova YV, Shukevich DL, Grigoriev EV. Perioperative dynamics of TLR2, TLR4, and TREM-1 expression in monocyte subpopulations in the setting of on-pump coronary artery bypass surgery. *ISRN Inflammation Volume 2013 (2013), Article ID 817901, 8 pages.*
194. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OF, Espevik T, Sundan A. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation.* 2002;105:685-690.
195. Koch A, Zacharowski K. Toll-like receptor pathway signaling is differently regulated in neutrophils and peripheral mononuclear cells of patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Crit Care Med.* 2009;37:132-9.
196. Hadley JS, Wang JE, Michaels LC, Dempsey CM, Foster SJ, Thiemermann C, Hinds CJ. Alterations in inflammatory capacity and TLR expression on monocytes and neutrophils after cardiopulmonary bypass. *Shock.* 2007;27(5):466-73.
197. Gong J, Wei T, Stark RW, Jamitzky F, Heckl WM, Anders HJ, Lech M, Rössle SC. Inhibition of Toll-like receptors TLR4 and 7 signaling pathways by SIGIRR: a computational approach. *J Struct Biol.* 2010;169(3):323-30.
198. Curtale G, Mirolo M, Renzi TA, Rossato M, Bazzoni F, Locati M. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10–dependent microRNA-146b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(28):11499-11504.
199. Peres A, Stegen C, Cousineau B, Desrosiers M, Madrenas J. The pro-inflammatory and anti-inflammatory TLR2 responses to *Staphylococcus aureus* can be uncoupled (P1242). *J Immunol.* 2013;190:138.19.
200. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology.* 2010;49(9):1618-31.
201. Abdel-Rahman U, Margraf S, Aybek T, Lögters T, Bitu-Moreno J, Francischetti I, Kranert T, Grünwald F, Windolf J, Moritz A, Scholz M. Inhibition of neutrophil activity improves cardiac function after cardiopulmonary bypass. *J Inflamm (Lond).* 2007;4:21.

202. Hadley JS, Wang JE, Michaels LC, Dempsey CM, Foster SJ, Thiernemann C, Hinds CJ. Alterations in inflammatory capacity and TLR expression on monocytes and neutrophils after cardiopulmonary bypass. *Shock*. 2007;27(5):466-73.
203. Meadows JP, Tumlin JA, Clemens MG, McKillop IH, Evans S. Changes in neutrophil activity following cardiovascular surgery. *Open Access Surgery*. 2011;(4)1-9.
204. Meadows JP, Tumlin JA, Clemens MG, McKillop IH, Evans S. Changes in neutrophil activity following cardiovascular surgery. *Open Access Surgery*. 2011;4:1-9.
205. Fung YL, Silliman CC, Minchinton RM, Wood P, Fraser JF. Cardiopulmonary bypass induces enduring alterations to host neutrophil physiology: a single-center longitudinal observational study. *Shock*. 2008;30(6):642-8.
206. Orr Y, Taylor JM, Cartland S, Bannon PG, Geczy C, Kritharides L. Conformational activation of CD11b without shedding of L-selectin on circulating human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2007;82(5):1115-25.
207. Edelman JJ, Fung YL, Pennings GJ, Reddel CJ, Bannon PG, Bayfield MS, Kritharides L, Fraser JF, Vallely MP. Off-pump coronary artery bypass surgery induces prolonged alterations to host neutrophil physiology. *Shock*. 2013;39(2):149-54.
208. Klesney-Tait J, Keck K, Li X, Gilfillan S, Otero K, Baruah S, Meyerholz DK, Varga SM, Knudson CJ, Moninger TO, Moreland J, Zabner J, Colonna M. Transepithelial migration of neutrophils into the lung requires TREM-1. *J Clin Invest*. 2013;123(1):138-49.
209. Fortin CF, Lesur O, Fulop T Jr. Effects of TREM-1 activation in human neutrophils: activation of signaling pathways, recruitment into lipid rafts and association with TLR4. *Int Immunol*. 2007;19(1):41-50.
210. Fung YL, Fraser JF, Wood P, Minchinton RM, Silliman CC. The systemic inflammatory response syndrome induces functional changes and relative hyporesponsiveness in neutrophils. *J Crit Care*. 2008;23(4):542-9.
211. Savitha D, Rao KR, Girish SP. Effect of surgical stress on neutrophil function. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2008;52(3):302-6.
212. Barclay AN, Ward HA. Purification and chemical characterisation of membrane glycoproteins from rat thymocytes and brain, recognised by monoclonal antibody MRC OX 2. *Eur J Biochem*. 1982;129(2):447-58.
213. Gorczynski RM, Lee L, Boudakov I. Augmented Induction of CD4⁺CD25⁺ Treg using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation*. 2005;79(9):1180-3.

214. Wright GJ, Puklavec MJ, Willis AC, Hoek RM, Sedgwick JD, Brown MH, Barclay AN. Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity*. 2000;13(2):233-42.
215. Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD. Down-Regulation of the Macrophage Lineage Through Interaction with OX2 (CD200). *Science*. 2000;290(5497):1768-71.
216. Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*. 2000;290(597):1768-71.
217. Graeber MB, Lopez-Redondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, Nakajima K, Kreutzberg GW, Kohsaka S. The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res*. 1998;813(2):241-53.
218. Taylor N, McConachie K, Calder C, Dawson R, Dick A, Sedgwick JD, Liversidge J. Enhanced tolerance to autoimmune uveitis in CD200-deficient mice correlates with a pronounced Th2 switch in response to antigen challenge. *J Immunol*. 2005;174(1):143-54.
219. Simelyte E, Criado G, Essex D, Uger RA, Feldmann M, Williams RO. CD200-Fc, a novel antiarthritic biologic agent that targets proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(4):1038-43.
220. Gorczynski RM, Chen Z, Fu XM, Zeng H. Increased expression of the novel molecule OX-2 is involved in prolongation of murine renal allograft survival. *Transplantation*. 1998;65:1106-14.
221. Gorczynski RM, Cattral MS, Chen Z, Hu J, Lei J, Min WP, Yu G, Ni J. An immunoadhesin incorporating the molecule OX-2 is a potent immunosuppressant that prolongs allo- and xenograft survival. *J Immunol*. 1999;163:1654-60.
222. Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M, Brooke G, Puklavec MJ, Bigler M, Song Y, Jenmalm M, Gorman D, McClanahan T, Liu MR, Brown MH, Sedgwick JD, Phillips JH, Barclay AN. Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol*. 2003;171(6):3034-46.
223. Hatherley D, Lea SM, Johnson S, Barclay AN. Structures of CD200/CD200 receptor family and implications for topology, regulation, and evolution. *Structure*. 2013;21(5):820-32.

224. Salata C, Curtarello M, Calistri A, Sartori E, Sette P, de Bernard M, Parolin C, Palù G. vOX2 glycoprotein of human herpesvirus 8 modulates human primary macrophages activity. *J Cell Physiol.* 2009;219(3):698-706.
225. Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, Brown MH. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.* 2002;23(6):285-90.
226. Vieites JM, de la Torre R, Ortega MA, Montero T, Peco JM, Sánchez-Pozo A, Gil A, Suárez A. Characterization of human cd200 glycoprotein receptor gene located on chromosome 3q12-13. *Gene.* 2003;311:99-104.
227. Akkaya M, Akin ML, Akkaya B, Barclay AN. Dissection of agonistic and blocking effects of CD200 receptor antibodies. *PLoS One.* 2013;8(5):e63325.
228. Akkaya M, Barclay AN. Heterogeneity in the CD200R paired receptor family. *Immunogenetics.* 2010;62(1):15-22.
229. Gorczynski R, Chen Z, Kai Y, Lee L, Wong S, Marsden PA. CD200 is a ligand for all members of the CD200R family of immunoregulatory molecules. *J Immunol.* 2004;172(12):7744-9.
230. Hatherley D, Cherwinski HM, Moshref M, Barclay AN. Recombinant CD200 protein does not bind activating proteins closely related to CD200 receptor. *J Immunol.* 2005;175(4):2469-74.
231. Minas K, Liversidge J. Is The CD200/CD200 Receptor Interaction More Than Just a Myeloid Cell Inhibitory Signal? *Crit Rev Immunol.* 2006;26(3):213-230.
232. Webb M, Barclay AN. Localisation of the MRC OX-2 glycoprotein on the surfaces of neurones. *J Neurochem.* 1984;43(4):1061-7.
233. Rosenblum MD, Olasz EB, Yancey KB, Woodliff JE, Lazarova Z, Gerber KA, Truitt RL. Expression of CD200 on epithelial cells of the murine hair follicle: a role in tissue-specific immune tolerance? *J Invest Dermatol.* 2004;123(5):880-7.
234. Dick AD, Broderick C, Forrester JV, Wright GJ. Distribution of OX2 antigen and OX2 receptor within retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(1):170-6.
235. Chen Z, Marsden PA, Gorczynski RM. Role of a distal enhancer in the transcriptional responsiveness of the human CD200 gene to interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Mol Immunol.* 2009;46(10):1951-63.
236. Chen Z, Marsden PA, Gorczynski RM. Cloning and characterization of the human CD200 promoter region. *Mol Immunol.* 2006;43(6):579-87.

237. Mukhopadhyay S, Plüddemann A, Hoe JC, Williams KJ, Varin A, Makepeace K, Akin ML, Bowdish DM, Smale ST, Barclay AN, Gordon S. Immune inhibitory ligand CD200 induction by TLRs and NLRs limits macrophage activation to protect the host from meningococcal septicemia. *Cell Host Microbe*. 2010;8(3):236-47.
238. Rosenblum MD, Olasz E, Woodliff JE, Johnson BD, Konkol MC, Gerber KA, Orentas RJ, Sandford G, Truitt RL. CD200 is a novel p53-target gene involved in apoptosis-associated immune tolerance. *Blood*. 2004;103(7):2691-8.
239. Koning N, van Eijk M, Pouwels W, Brouwer MS, Voehringer D, Huitinga I, Hoek RM, Raes G, Hamann J. Expression of the inhibitory CD200 receptor is associated with alternative macrophage activation. *J Innate Immun*. 2010;2(2):195-200.
240. Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M, Brooke G, Puklavec MJ, Bigler M, Song Y, Jenmalm M, Gorman D, McClanahan T, Liu MR, Brown MH, Sedgwick JD, Phillips JH, Barclay AN. Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol*. 2003;171(6):3034-46.
241. Rijkers ES, de Ruiter T, Baridi A, Veninga H, Hoek RM, Meyaard L. The inhibitory CD200R is differentially expressed on human and mouse T and B lymphocytes. *Mol Immunol*. 2008;45(4):1126-35.
242. Jenmalm MC, Cherwinski H, Bowman EP, Phillips JH, Sedgwick JD. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. *J Immunol*. 2006;176(1):191-9.
243. Karra L, Berent-Maoz B, Ben-Zimra M, Levi-Schaffer F. Are we ready to downregulate mast cells? *Curr Opin Immunol*. 2009;21(6):708-14.
244. Shuli Zhang 1 and Joseph H. Phillips. Identification of tyrosine residues crucial for CD200R-mediated inhibition of mast cell activation. *J Leukoc Biol*. 2006;79(2):363-8.
245. Mahrshahi R, Barclay AN, Brown MH. Essential roles for Dok2 and RasGAP in CD200 receptor-mediated regulation of human myeloid cells. *J Immunol*. 2009;183(8):4879-86.
246. Zhang S, Phillips JH. Identification of tyrosine residues crucial for CD200R-mediated inhibition of mast cell activation. *J Leukoc Biol*. 2006;79(2):363-8.
247. Rijkers ES, de Ruiter T, Buitenhuis M, Veninga H, Hoek RM, Meyaard L. Ligation of CD200R by CD200 is not required for normal murine myelopoiesis. *Eur J Haematol*. 2007;79(5):410-6.
248. Zhang S, Cherwinski H, Sedgwick JD, Phillips JH. Molecular mechanisms of CD200 inhibition of mast cell activation. *J Immunol*. 2004;173(11):6786-93.

249. Jenmalm MC, Cherwinski H, Bowman PE, Phillips JH, Sedgwick JD. Regulation of Myeloid Cell Function through the CD200 Receptor1. *J Immunol.* 2006;176(1):191-199.
250. Lettau M, Pieper J, Janssen O. Nck adapter proteins: functional versatility in T cells. *Cell Commun Signal.* 2009;7:1.
251. Mahrshahi R, Brown MH. Downstream of tyrosine kinase 1 and 2 play opposing roles in CD200 receptor signaling. *J Immunol.* 2010;185(12):7216-22.
252. Ko YC, Chien HF, Jiang-Shieh YF, Chang CY, Pai MH, Huang JP, Chen HM, Wu CH. Endothelial CD200 is heterogeneously distributed, regulated and involved in immune cell-endothelium interactions. *J Anat.* 2009;214(1):183-95.
253. Masocha W. Systemic lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation results in different temporal reduction of CD200 and CD200 receptor gene expression in the brain. *J Neuroimmunol.* 2009;214(1-2):78-82.
254. Fallarino F, Asselin-Paturel C, Vacca C, Bianchi R, Gizzi S, Fioretti MC, Trinchieri G, Grohmann U, Puccetti P. Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J Immunol.* 2004;173(6):3748-54.
255. Fallarino F, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Gizzi S, Asselin-Paturel C, Fioretti MC, Trinchieri G, Grohmann U, Puccetti P. Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in plasmacytoid dendritic cells. *Int Immunol.* 2005;17(11):1429-38.
256. Gorczynski R, Boudakov I, Khatri I. A comparison of the biological properties of small molecular weight agonists and antagonists of CD200:CD200R interactions. *Med Chem.* 2008;4(6):624-31
257. Gorczynski R, Boudakov I, Khatri I. Peptides of CD200 modulate LPS-induced TNF- α induction and mortality in vivo. *J Surg Res.* 2008;145(1):87-96.
258. Chen Z, Chen DX, Kai Y, Khatri I, Lamptey B, Gorczynski RM. Identification of an expressed truncated form of CD200, CD200tr, which is a physiologic antagonist of CD200-induced suppression. *Transplantation.* 2008;86(8):1116-24.
259. Chen Z, Chen DX, Kai Y, Khatri I, Lamptey B, Gorczynski RM. Identification of an expressed truncated form of CD200, CD200tr, which is a physiologic antagonist of CD200-induced suppression. *Transplantation.* 2008;86(8):1116-24.

260. Chen Z, Ma X, Zhang J, Hu J, Gorczynski RM. Alternative splicing of CD200 is regulated by an exonic splicing enhancer and SF2/ASF. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(19):6684-96.
261. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(3):185-93.
262. Kos O, Hughson RL, Hart DA, Clément G, Frings-Meuthen P, Linnarsson D, Paloski WH, Rittweger J, Wuyts F, Zange J, Gorczynski RM. Elevated serum soluble CD200 and CD200R as surrogate markers of bone loss under bed rest conditions. *Bone.* 2014;60:33-40.
- 263 51. Wong KK, Zhu F, Khatri I, Huo Q, Spaner DE, Gorczynski RM. Characterization of CD200 Ectodomain Shedding. *PLoS One.* 2016;11(4):e0152073.
264. Gorczynski RM, Chen Z, Lee L, Yu K, Hu J. Anti-CD200R ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *Clin Immunol.* 2002;104(3):256-64.
265. Gorczynski RM, Chen Z, Khatri I, Podnos A, Yu K. Cure of metastatic growth of EMT6 tumor cells in mice following manipulation of CD200:CD200R signaling. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;142(2):271-82.
266. Walker DG, Lue LF. Understanding the neurobiology of CD200 and the CD200 receptor: a therapeutic target for controlling inflammation in human brains? *Future Neurol.* 2013;8(3).
267. Liao KL, Bai XF, Friedman A. The role of CD200-CD200R in tumor immune evasion. *J Theor Biol.* 2013;328:65-76.
268. Varin A, Pontikoglou C, Labat E, Deschaseaux F, Sensebé L. CD200R/CD200 inhibits osteoclastogenesis: new mechanism of osteoclast control by mesenchymal stem cells in human. *PLoS One.* 2013;8(8):e72831.
270. Yu K, Chen Z, Gorczynski R. Effect of CD200 and CD200R1 expression within tissue grafts on increased graft survival in allogeneic recipients. *Immunol Lett.* 2013;149(1-2):1-8.
271. Oursler MJ. Recent advances in understanding the mechanisms of osteoclast precursor Pion. *J Cell Biochem.* 2010;110(5):1058-62.
272. Weiguo Cui, Esteban Cuartas, Juan Ke, Qing Zhang, Halldor B. Einarsson, Jonathon D. Sedgwick, Jun Li, Agnès Vignery. CD200 and its receptor, CD200R, modulate bone mass via the differentiation of osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(36):14436-41.
273. Lee L, Liu J, Manuel J, Gorczynski RM. A role for the immunomodulatory molecules CD200 and CD200R in regulating bone formation. *Immunol Lett.* 2006;105:150-158.

274. Varin A, Pontikoglou C, Labat E, Deschaseaux F, Sensebé L. CD200R/CD200 inhibits osteoclastogenesis: new mechanism of osteoclast control by mesenchymal stem cells in human. *PLoS One*. 2013 Aug 5;8(8):e72831.
275. Gajewski TF, Meng Y, Blank C, Brown I, Kacha A, Kline J, Harlin H. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol Rev*. 2006;213:131-45.
276. Rygiel TP, Karnam G, Goverse G, van der Marel AP, Greuter MJ, van Schaarenburg RA, Visser WF, Brenkman AB, Molenaar R, Hoek RM, Mebius RE, Meyaard L. CD200-CD200R signaling suppresses anti-tumor responses independently of CD200 expression on the tumor. *Oncogene*. 2012;31(24):2979-88.
277. Moreaux J, Veyrune JL, Reme T, De Vos J, Klein B. CD200: a putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(1):117-22.
278. Dorfman, David M. MD, PhD, Shahsafaei, Aliakbar MS. CD200 (OX-2 Membrane Glycoprotein) is Expressed by Follicular T Helper Cells and in Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(1):76-83.
279. Talebian F, Liu JQ, Liu Z, Khattabi M, He Y, Ganju R, Bai XF. Melanoma cell expression of CD200 inhibits tumor formation and lung metastasis via inhibition of myeloid cell functions. *PloS one*. 2012;7(2):e31442.
280. Dorfman DM, Shahsafaei A. CD200 (OX-2 membrane glycoprotein) expression in b cell-derived neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(5):726-33.
281. Kawasaki BT, Mistree T, Hurt EM, Kalathur M, Farrar WL. Co-expression of the toleragenic glycoprotein CD200, with markers for cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 364(4):778-782.
282. Tonks A, Hills R, White P, Rosie B, Mills KI, Burnett AK, Darley RL. CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2007;21(3):566-8.
283. Moreaux J, Hose D, Reme T, Jourdan E, Hundemer M, Legouffe E, Moine P, Bourin P, Moos M, Corre J, Möhler T, De Vos J, Rossi JF, Goldschmidt H, Klein B. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2006;108(13):4194-7.
284. Dorfman DM, Shahsafaei A. CD200 (OX-2 membrane glycoprotein expression in b cell-derived neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(5):726-33.
285. Wong KK, Khatri I, Shaha S, Spaner DE, Gorczynski RM. The role of CD200 in immunity to B cell lymphoma. *J Leukoc Biol*. 2010;88(2):361-72.
286. Petermann KB, Rozenberg GI, Zedek D, Groben P, McKinnon K, Buehler C, Kim WY, Shields JM, Penland S, Bear JE, Thomas NE, Serody JS, Sharpless NE. CD200 is induced by

- ERK and is a potential therapeutic target in melanoma. *J Clin Invest.* 2007; 117(12):3922-3929.
287. Liu JQ, Talebian F, Wu L, Liu Z, Li MS, Wu L, Zhu J, Markowitz J, Carson WE 3rd, Basu S, Bai XF. A Critical Role for CD200R Signaling in Limiting the Growth and Metastasis of CD200+ Melanoma. *J Immunol.* 2016;197(4):1489-97.
288. Gorczynski RM, Clark DA, Erin N, Khatri I. Role of CD200 expression in regulation of metastasis of EMT6 tumor cells in mice. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(1):49-60.
289. Gorczynski RM, Chen Z, Diao J, Khatri I, Wong K, Yu K, Behnke J. Breast cancer cell CD200 expression regulates immune response to EMT6 tumor cells in mice. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123(2):405-15.
290. Sun H, Xu J, Huang M, Huang Q, Sun R, Xiao W, Sun C. CD200R, a co-inhibitory receptor on immune cells, predicts the prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Immunol Lett.* 2016;178:105-13.
291. Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, Cofield R, Faas SJ, Bowdish KS. Blockade of CD200 in the presence or absence of antibody effector function: implications for anti-CD200 therapy. *J Immunol.* 2008;180(2):699-705.
292. Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, Ravey EP, McWhirter J, Oltean D, Frederickson S, Maruyama T, Wild MA, Nolan MJ, Wu D, Springhorn J, Bowdish KS. CD200 expression on tumor cells suppresses antitumor immunity: new approaches to cancer immunotherapy. *J Immunol.* 2007;178(9):5595-605.
293. Coles SJ, Wang EC, Man S, Hills RK, Burnett AK, Tonks A, Darley RL. CD200 expression suppresses natural killer cell function and directly inhibits patient anti-tumor response in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2011;25(5):792-9.
294. Chung YH, Means RE, Choi JK, Lee BS, Jung JU. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus OX2 glycoprotein activates myeloid-lineage cells to induce inflammatory cytokine production. *J Virol.* 2002;76(10):4688-98.
295. Foster-Cuevas M, Wright GJ, Puklavec MJ, Brown MH, Barclay AN. Human herpesvirus 8 K14 protein mimics CD200 in down-regulating macrophage activation through CD200 receptor. *J Virol.* 2004;78(14):7667-76.
296. Salata C, Curtarello M, Calistri A, Sartori E, Sette P, de Bernard M, Parolin C, Palù G. vOX2 glycoprotein of human herpesvirus 8 modulates human primary macrophages activity. *J Cell Physiol.* 2009;219(3):698-706.

297. Shiratori I, Yamaguchi M, Suzukawa M, Yamamoto K, Lanier LL, Saito T, Arase H. Down-regulation of basophil function by human CD200 and human herpesvirus-8 CD200. *J Immunol.* 2005;175(7):4441-9.
298. Cameron CM, Barrett JW, Liu L, Lucas AR, McFadden G. Myxoma virus M141R expresses a viral CD200 (vOX-2) that is responsible for down-regulation of macrophage and T-cell activation in vivo. *J Virol.* 2005;79(10):6052-67.
299. Rezaee SA, Gracie JA, McInnes IB, Blackbourn DJ. Inhibition of neutrophil function by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vOX2 protein. *AIDS.* 2005;19(16):1907-10.
300. Rygiel TP, Rijkers ES, de Ruiter T, Stolte EH, van der Valk M, Rimmelzwaan GF, Boon L, van Loon AM, Coenjaerts FE, Hoek RM, Tesselaar K, Meyaard L. Lack of CD200 enhances pathological T cell responses during influenza infection. *J Immunol.* 2009;183(3):1990-6.
301. Sarangi PP, Woo SR, Rouse BT. Control of viral immunoinflammatory lesions by manipulating CD200:CD200 receptor interaction. *Clin Immunol.* 2009;131(1):31-40.
302. Takabayshi K, Corr M, Hayashi T, Redecke V, Beck L, Guiney D, Sheppard D, Raz E. Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. *Immunity.* 2006;24(4):475-87.
303. Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, Desmet C, Quesada Calvo F, Henry E, Closset R, Dewals B, Thielen C, Gustin P, de Leval L, Van Rooijen N, Le Moine A, Vanderplasschen A, Cataldo D, Drion PV, Moser M, Lekeux P, Bureau F. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(12):3723-38.
304. Jiang-Shieh YF, Chien HF, Chang CY, Wei TS, Chiu MM, Chen HM, Wu CH. Distribution and expression of CD200 in the rat respiratory system under normal and endotoxin-induced pathological conditions. *J Anat.* 2010;216(3):407-16.
305. Holt PG, Strickland DH. The CD200-CD200R axis in local control of lung inflammation. *Nat Immunol.* 2008;9(9):1011-3.
306. Snelgrove RJ, Goulding J, Didierlaurent AM, Lyonga D, Vekaria S, Edwards L, Gwyer E, Sedgwick JD, Barclay AN, Hussell T. A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nat Immunol.* 2008;9(9):1074-83.
307. Sakthivel P, Breithaupt A, Gereke M, Copland DA, Schulz C, Gruber AD, Dick AD, Schreiber J, Bruder D. Soluble CD200 Correlates With Interleukin-6 Levels in Sera of

- COPD Patients: Potential Implication of the CD200/CD200R Axis in the Disease Course. *Lung*. 2017;195(1):59-68.
308. Lynch MA. The multifaceted profile of activated microglia. *Mol Neurobiol*. 2009;40(2):139-56.
309. Wu CY, Kaur C, Sivakumar V, Lu J, Ling EA. Kv1.1 expression in microglia regulates production and release of proinflammatory cytokines, endothelins and nitric oxide. *Neuroscience*. 2009;158(4):1500-8.
310. Persson M, Brantefjord M, Hansson E, Rönnbäck L. Lipopolysaccharide increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake capacity in vitro by a mechanism dependent on TNF- α . *Glia*. 2005;51(2):111-20.
311. Chao CC, Gekker G, Hu S, Peterson PK. Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines. *J Immunol*. 1994;152(3):1246-52.
312. Matsumoto H, Kumon Y, Watanabe H, Ohnishi T, Takahashi H, Imai Y, Tanaka J. Expression of CD200 by macrophage-like cells in ischemic core of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett*. 2007;418(1):44-8.
313. Walker DG, Dalsing-Hernandez JE, Campbell NA, Lue LF. Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer's disease: a potential mechanism leading to chronic inflammation. *Exp Neurol*. 2009;215(1):5-19.
314. Masocha W. Systemic lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation results in different temporal reduction of CD200 and CD200 receptor gene expression in the brain. *J Neuroimmunol*. 2009;214(1-2):78-82.
315. Lyons A, McQuillan K, Deighan BF, O'Reilly JA, Downer EJ, Murphy AC, Watson M, Piazza A, O'Connell F, Griffin R, Mills KH, Lynch MA. Decreased neuronal CD200 expression in IL-4-deficient mice results in increased neuroinflammation in response to lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*. 2009;23(7):1020-7.
316. Yi MH, Zhang E, Kim JJ, Baek H, Shin N, Kim S, Kim SR, Kim HR, Lee SJ, Park JB, Kim Y, Kwon OY, Lee YH, Oh SH, Kim DW. CD200R/Foxp3-mediated signalling regulates microglial activation. *Sci Rep*. 2016;6:34901.
317. Hernangómez M, Klusáková I, Joukal M, Hradilová-Svíženská I, Guaza C, Dubový P. CD200R1 agonist attenuates glial activation, inflammatory reactions, and hypersensitivity immediately after its intrathecal application in a rat neuropathic pain model. *J Neuroinflammation*. 2016;13:43.

318. Wang XJ, Ye M, Zhang YH, Chen SD. CD200-CD200R regulation of microglia activation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007;2(3):259-64.
319. Luo XG, Zhang JJ, Zhang CD, Liu R, Zheng L, Wang XJ, Chen SD, Ding JQ. Altered regulation of CD200 receptor in monocyte-derived macrophages from individuals with Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2010;35(4):540-7.
320. Miller AM, Deighan BF, Downer E, Lyon A, Henric-Noak P; Nolan YM, Lynch MA. Analysis of the impact of CD200 on neurodegeneration Analysis of the Impact of CD200 on Neurodegenerative Diseases - Processes, Prevention, Protection and Monitoring, Dr Raymond Chuen-Chung Chang (Ed.), InTech. 2011; DOI: 10.5772/32003.
321. Udan ML, Ajit D, Crouse NR, Nichols MR. Toll-like receptors 2 and 4 mediate Abeta (1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *J Neurochem.* 2008;104(2):524-33.
322. Lue LF, Kuo YM, Beach T, Walker DG. Microglia activation and anti-inflammatory regulation in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 2010;41(2-3):115-28.
323. Sato K, Eizumi K, Fukaya T, Fujita S, Sato Y, Takagi H, Yamamoto M, Yamashita N, Hijikata A, Kitamura H, Ohara O, Yamasaki S, Saito T, Sato K. Naturally occurring regulatory dendritic cells regulate murine cutaneous chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2009;113(19):4780-9.
324. Yu K, Chen Z, Wang S, Gorczynski R. Decreased alloreactivity using donor cells from mice expressing a CD200 transgene under control of a tetracycline-inducible promoter. *Transplantation.* 2005;80(3):394-401.
325. Gorczynski RM, Chen Z, He W, Khatri I, Sun Y, Yu K, Boudakov I. Expression of a CD200 transgene is necessary for induction but not maintenance of tolerance to cardiac and skin allografts. *J Immunol.* 2009;183(3):1560-8.
326. Gorczynski RM. Transplant tolerance modifying antibody to CD200 receptor, but not CD200, alters cytokine production profile from stimulated macrophages. *Eur J Immunol.* 2001;31(8):2331-7.
327. Gorczynski R, Chen Z, Shivagnahnam S, Taseva A, Wong K, Yu K, Khatri I. CD200Fc(Gly)6TGFβ suppresses transplant rejection and MLCs in vitro. *J Immunol.* 2010;184:49.15.

328. Gorczynski R, Chen Z, Shivagnahnam S, Taseva A, Wong K, Yu K, Khatri I. Potent immunosuppression by a bivalent molecule binding to CD200R and TGF-betaR. *Transplantation*. 2010;90(2):150-9.
329. Ichim TE, Zhong R, Min WP. Prevention of allograft rejection by in vitro generated tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol*. 2003;11(3-4):295-306.
330. Matsue H. CD 200-mediated regulation of skin immunity. *J Invest Dermatol*. 2005;125(6):x-xi.
331. Xiong N, Kang C, Raulet DH. Positive selection of dendritic epidermal gammadelta T cell precursors in the fetal thymus determines expression of skin-homing receptors. *Immunity*. 2004;21(1):121-31.
332. Rosenblum MD, Woodliff JE, Madsen NA, McOlash LJ, Keller MR, Truitt RL. Characterization of CD 200-receptor expression in the murine epidermis. *J Invest Dermatol*. 2005;125(6):1130-8.
333. Abbas O, Mahalingam M; Epidermal stem cells: practical perspectives and potential uses. *Br J Dermatol*. 2009;161(2):228-36.
334. Purba TS, Haslam IS, Poblet E, Jiménez F, Gandarillas A, Izeta A, Paus R. Human epithelial hair follicle stem cells and their progeny: Current state of knowledge, the widening gap in translational research and future challenges. *BioEssays*. 2014; 36(5):513.
335. Inoue K, Aoi N, Sato T, Yamauchi Y, Suga H, Eto H, Kato H, Araki J, Yoshimura K; Differential expression of stem-cell-associated markers in human hair follicle epithelial cells. *Lab Invest*. 2009;89(8):844-56.
336. Garza LA, Yang CC, Zhao T, Blatt HB, Lee M, He H, Stanton DC, Carrasco L, Spiegel JH, Tobias JW, Cotsarelis G. Bald scalp in men with androgenetic alopecia retains hair follicle stem cells but lacks CD200-rich and CD34-positive hair follicle progenitor cells. *J Clin Invest*. 2011;121(2):613-22.
337. Rosenblum MD, Yancey KB, Olasz EB, Truitt RL. CD200, a "no danger" signal for hair follicles. *J Dermatol Sci*. 2006;41(3):165-74.
338. Mohanty S, Kumar A, Dhawan J, Sharma VK, Gupta S. Depletion of CD200+ hair follicle stem cells in human prematurely grey hair follicles. *J Cutan Aesthet Surg*. 2013;6:90-2.
339. Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(6):223.

340. Schröder AE, Greiner A, Seyfert C, Berek C. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(1):221-5.
341. Alves JD, Marinho A, Serra MJ. Tocilizumab: is there life beyond anti-TNF blockade? *Int J Clin Pract*. 2011;65(4):508-13.
342. Gorczynski RM, Chen Z, Yu K, Hu J. CD200 immunoadhesin suppresses collagen-induced arthritis in mice. *Clin Immunol*. 2001;101(3):328-34.
343. Simelyte E, Criado G, Essex D, Uger RA, Feldmann M, Williams RO;CD200-Fc, a novel antiarthritic biologic agent that targets proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(4):1038-43.
344. Simelyte E, Alzabin S, Boudakov I, Williams R. CD200R1 regulates the severity of arthritis but has minimal impact on the adaptive immune response. *Clin Exp Immunol*. 2010;162(1):163-8.
345. Gorczynski RM, Chen Z, Lee L, Yu K, Hu J. Anti-CD200R ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *Clin Immunol*. 2002;104(3):256-64.
346. Longhini AL, von Glehn F, Brandão CO, de Paula RF, Pradella F, Moraes AS, Farias AS, Oliveira EC, Quispe-Cabanillas JG, Abreu CH, Damasceno A, Damasceno BP, Balashov KE, Santos LM. Plasmacytoid dendritic cells are increased in cerebrospinal fluid of untreated patients during multiple sclerosis relapse. *J Neuroinflammation*. 2011;8(1):2.
347. Meuth SG, Simon OJ, Grimm A, Melzer N, Herrmann AM, Spitzer P, Landgraf P, Wiendl H. CNS inflammation and neuronal degeneration is aggravated by impaired CD200-CD200R-mediated macrophage silencing. *J Neuroimmunol*. 2008;194(1-2):62-9.
348. Chitnis T, Imitola J, Wang Y, Elyaman W, Chawla P, Sharuk M, Raddassi K, Bronson RT, Khoury SJ. Elevated neuronal expression of CD200 protects Wlds mice from inflammation-mediated neurodegeneration. *Am J Pathol*. 2007;170(5):1695-712.
349. Koning N, Swaab DF, Hoek RM, Huitinga I. Distribution of the immune inhibitory molecules CD200 and CD200R in the normal central nervous system and multiple sclerosis lesions suggests neuron-glia and glia-glia interactions. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009;68(2):159-67.
350. Koning N, Uitdehaag BM, Huitinga I, Hoek RM. Restoring immune suppression in the multiple sclerosis brain. *Prog Neurobiol*. 2009;89(4):359-68.

351. Kobayashi A, Imamura H, Isobe M, Matsuyama Y, Soeda J, Matsunaga K, Kawasaki S. Mac-1 (CD11b/CD18) and intercellular adhesion molecule-1 in ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281(2):G577-85.
352. Liu Y, Bando Y, Vargas-Lowy D, Elyaman W, Khoury SJ, Huang T, Reif K, Chitnis T. CD200R1 agonist attenuates mechanisms of chronic disease in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci*. 2010;30(6):2025-38.
353. Walker DG, Lue LF. Understanding the neurobiology of CD200 and the CD200 receptor: a therapeutic target for controlling inflammation in human brains? *Future Neurol*. 2013;8(3).
354. Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW; Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res*. 2007;101(3):234-47.
355. Shaik SS, Soltan TD, Chaturvedi G, Totapally B, Hagood JS, Andrews WW, Athar M, Killingsworth CR, Patel RP, Fallon MB, Maheshwari A. Low intensity shear stress increases endothelial ELR+ CXC chemokine production via a focal adhesion kinase-p38{beta} MAPK-NF- κ B pathway. *J Biol Chem*. 2009;284(9):5945-55.
356. Jiang-Shieh YF, Chien HF, Chang CY, Wei TS, Chiu MM, Chen HM, Wu CH. Distribution and expression of CD200 in the rat respiratory system under normal and endotoxin-induced pathological conditions. *J Anat*. 2010;216(3):407-16.
357. Ko YC, Chien HF, Jiang-Shieh YF, Chang CY, Pai MH, Huang JP, Chen HM, Wu CH. Endothelial CD200 is heterogeneously distributed, regulated and involved in immune cell-endothelium interactions. *J Anat*. 2009;214(1):183-95.
358. Goronzy JJ, Weyand CM. Immunosuppression in atherosclerosis: mobilizing the opposition within. *Circulation*. 2006;114(18):1901-4.
359. Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest*. 1997;99(5):901-14.
360. Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol*. 1991;9:457-492.
361. Galli SJ, Tsai M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol*. 2010;40(7):1843-51.
362. Zhang S, Cherwinski H, Sedgwick JD, Phillips JH. Molecular mechanisms of CD200 inhibition of mast cell activation. *J Immunol*. 2004;173(11):6786-93.

363. Cherwinski HM, Murphy CA, Joyce BL, Bigler ME, Song YS, Zurawski SM, Moshrefi MM, Gorman DM, Miller KL, Zhang S, Sedgwick JD, Phillips JH. The CD200 receptor is a novel and potent regulator of murine and human mast cell function. *J Immunol.* 2005;174(3):1348-56.
364. Nakamura T, Fukaya T, Uto T, Takagi H, Arimura K, Tono T, Sato K. (2017). Selective depletion of basophils ameliorates immunoglobulin E-mediated anaphylaxis. *Biochemistry and Biophysics Reports.* 2017;9:29-35.
365. Edmond, Valérie; Ghali, Benoist; Penna, Aubin; Taupin, Jean-Luc; Daburon, Sophie; Moreau, Jean-François; Legembre, Patrick; Houtman, Jon C. D. Precise mapping of the CD95 pre-ligand assembly domain. *PLoS One.* 2012;7(9):e46236.
366. Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, Ruberti G. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem.* 1999;274(53):38241-50.
367. Beier CP, Kölbl M, Beier D, Woertgen C, Bogdahn U, Brawanski A. CD95/Fas mediates cognitive improvement after traumatic brain injury. *Cell Res.* 2007;17(8):732-4.
368. Desbarats J, Newell MK. Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat Med.* 2000;6(8):920-3.
369. Sodeman T, Bronk SF, Roberts PJ, Miyoshi H, Gores GJ. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;278(6):G992-9.
370. Papoff G, Cascino I, Eramo A, Starace G, Lynch DH, Ruberti G. An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro. *J Immunol.* 1996;156(12):4622-30.
371. Strand S, Vollmer P, van den Abeelen L, Gottfried D, Alla V, Heid H, Kuball J, Theobald M, Galle PR, Strand D. Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells. *Oncogene.* 2004;23(20):3732-6.
372. Yufu Y, Choi I, Hirase N, Tokoro A, Noguchi Y, Goto T, Uike N, Kozuru M. Soluble Fas in the serum of patients with non-Hodgkin's lymphoma: higher concentrations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Hematol.* 1998;58(4):334-6.
373. Nozawa K, Kayagaki N, Tokano Y, Yagita H, Okumura K, Hasimoto H. Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 1997;40(6):1126-9.

374. Pinti M, Nasi M, Moretti L, Mussini C, Petrusca D, Esposito R, Cossarizza A. Quantitation of CD95 and CD95L mRNA expression in chronic and acute HIV-1 infection by competitive RT-PCR. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;926:46-51.
375. Hammam O, Mahmoud O, Zahran M, Aly S, Hosny K, Helmy A, Anas A. The role of fas/fas ligand system in the pathogenesis of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon.* 2012;12(11):e6132.
376. F Larousserie, D Berrebi, A Florentin, P De Lagausie, Y Aigrain, M Peuchmaur. Down-regulation of CD95 (Fas/Apo-1) in the epithelia of adenovirus-infected appendices. *Histopathology.* 1997;31(4):342-6.
377. Schreiber M, Sedger L, McFadden G. Distinct domains of M-T2, the myxoma virus tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, mediate extracellular TNF binding and intracellular apoptosis inhibition. *J Virol.* 1997;71:2171-2181
378. Guerin JL, Gelfi J, Boullier S, Delverdier M, Bellanger FA, Bertagnoli S, Drexler I, Sutter G, Messud-Petit F. Myxoma virus leukemia-associated protein is responsible for major histocompatibility complex class I and Fas-CD95 down-regulation and defines scrapins, a new group of surface cellular receptor abductor proteins. *J Virol.* 2002;76(6):2912-23.
379. Sträter J, Hinz U, Hasel C, Bhanot U, Mechtersheimer G, Lehnert T, Möller P. Impaired CD95 expression predisposes for recurrence in curatively resected colon carcinoma: clinical evidence for immunoselection and CD95L mediated control of minimal residual disease. *Gut.* 2005;54(5):661-5.
380. Peter ME, Legembre P, Barnhart BC. Does CD95 have tumor promoting activities? *Biochim Biophys Acta.* 2005;1755(1):25-36.
381. Baldwin RL, Tran H, Karlan BY. Primary ovarian cancer cultures are resistant to Fas-mediated apoptosis. *Gynecol Oncol.* 1999;74(2):265-71.
382. Chen L, Park SM, Tumanov AV, Hau A, Sawada K, Feig C, Turner JR, Fu YX, Romero IL, Lengyel E, Peter ME. CD95 promotes tumour growth. *Nature.* 2010;465:492-496.
383. Steller EJ1, Ritsma L, Raats DA, Hoogwater FJ, Emmink BL, Govaert KM, Laoukili J, Rinkes IH, van Rheeën J, Kranenburg O. The death receptor CD95 activates the cofilin pathway to stimulate tumour cell invasion. *EMBO Rep.* 2011;12(9): 931-937.
384. Letellier E1, Kumar S, Sancho-Martinez I, Krauth S, Funke-Kaiser A, Laudenklos S, Konecki K, Klussmann S, Corsini NS, Kleber S, Drost N, Neumann A, Lévi-Strauss M, Brors B, Gretz N, Edler L, Fischer C, Hill O, Thiemann M, Biglari B, Karray S, Martin-Villalba A..

- CD95-ligand on peripheral myeloid cells activates Syk kinase to trigger their recruitment to the inflammatory site. *Immunity*. 2010; 32(2):240-52.
385. Sancho-Martinez I, Martin-Villalba A. Tyrosine phosphorylation and CD95: a FAScinating switch. *Cell Cycle*. 2009; 8(6):838-42.
386. Gulbins E, Hermisson M, Brenner B, Grassme HU, Linderkamp O, Dichgans J, Weller M, Lang F. Cellular stimulation via CD95 involves activation of phospho-inositide-3-kinase. *Pflugers Arch*. 1998; 435:546-54.
387. Wang F, Lu Z, Hawkes M, Yang H, Kain KC, Liles WC (2010) Fas (CD95) induces rapid, TLR4/IRAK4-dependent release of pro-inflammatory HMGB1 from macrophages. *J Inflamm (Lond)*. 2010;7:30.
388. Ricci-Vitiani L, Conticello C, Zeuner A, De Maria R. CD95/CD95L interactions and their role in autoimmunity. *Apoptosis*. 2000;5(5):419-24.
389. Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2000;1(6):469-74.
390. Mountz JD, Li J, Hsu HC. Systemic autoimmunity caused by fas deficiency in macrophages: a new perspective on the first identified autoimmunity gene. *Arthritis Rheum*. 2012;64(3):609-12.
391. García-Fuster MJ, Ferrer-Alcón M, Miralles A, García-Sevilla JA. Deglycosylation of Fas receptor and chronic morphine treatment up-regulate high molecular mass Fas aggregates in the rat brain. *Eur J Pharmacol*. 2004;496(1-3):63-9.
392. Bénéteau M, Pizon M, Chaigne-Delalande B, Daburon S, Moreau P, De Giorgi F, Ichas F, Rebillard A, Dimanche-Boitrel MT, Taupin JL, Moreau JF, Legembre P. Localization of Fas/CD95 into the lipid rafts on down-modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Mol Cancer Res*. 2008;6(4):604-13.
383. Janssen O1, Qian J, Linkermann A, Kabelitz D. CD95 ligand – death factor and costimulatory molecule? *Cell Death Differ*. 2003;10(11):1215-25.
394. Gajate C, Mollinedo F. Cytoskeleton-mediated death receptor and ligand concentration in lipid rafts forms apoptosis-promoting clusters in cancer chemotherapy. *J Biol Chem*. 2005;280:11641-11647.
395. Nachbur U, Kassahn D, Yousefi S, Legler DF, Brunner T. Posttranscriptional regulation of Fas (CD95) ligand killing activity by lipid rafts. *Blood*. 2006;107(7):2790-6.

396. Sun M, Lee S, Karray S, Levi-Strauss M, Ames KT, Fink PJ. Cutting edge: two distinct motifs within the Fas ligand tail regulate Fas ligand-mediated costimulation. *J Immunol.* 2007;179(9):5639-43.
397. Zuccato E, Blott EJ, Holt O, Sigismund S, Shaw M, Bossi G, Griffiths GM. Sorting of Fas ligand to secretory lysosomes is regulated by mono-ubiquitylation and phosphorylation. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 1):191-9.
398. Lettau M, Beyer A, Janssen O. Novel monoclonal antibodies for the investigation of PCH family proteins. *Signal Transduction.* 2007;7:320-328.
399. Watts AD, Hunt NH, Wanigasekara Y, Bloomfield G, Wallach D, Roufogalis BD, Chaudhri G. A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'. *EMBO J.* 1999;18(8):2119-26.
400. Voss M1, Lettau M, Paulsen M, Janssen O. Posttranslational regulation of Fas ligand function. *Cell Commun Signal.* 2008;6:11.
401. Hoogwater FJ, Snoeren N, Nijkamp MW, Gunning AC, VAN Houdt WJ, DE Bruijn MT, Voest EE, VAN Hillegersberg R, Kranenburg O, Rinkes IH. Circulating CD95-ligand as a potential prognostic marker for recurrence in patients with synchronous colorectal liver metastases. *Anticancer Res.* 2011;31(12):4507-12.
402. Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature.* 1998;396(6712):699-703.
403. Boursalian TE, Fink PJ. Mutation in fas ligand impairs maturation of thymocytes bearing moderate affinity T cell receptors. *J Exp Med.* 2003;198(2):349-360.
404. Lettau M, Paulsen M, Kabelitz D, Janssen O. Storage, expression and function of Fas ligand, the key death factor of immune cells. *Curr Med Chem.* 2008;15(17):1684-96.
405. Blott EJ, Bossi G, Clark R, Zvelebil M, Griffiths GM, Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 13):2405-16.
406. Eischen CM, Schilling JD, Lynch DH, Krammer PH and Leibson PJ (1996) Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis *J Immunol.* 1996;156(8):2693-9.

407. Weber LM, Krammer PH. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin. Immunol.* 2003;15:145-157.
408. Choi C1, Park JY, Lee J, Lim JH, Shin EC, Ahn YS, Kim CH, Kim SJ, Kim JD, Choi IS, Choi IH. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF- α , or IFN- γ . *J Immunol.* 1999;162(4):1889-95.
409. Guller S, LaChapelle L. The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-fetal interfaces. *Semin Reprod Endocrinol.* 1999;17(1):39-44.
410. Jörn Sträter, Sara M. Mariani, Henning Walczak, Frank G. Rücker, Frank Leithäuser, Peter H. Krammer, and Peter Möller CD95 Ligand (CD95L) in Normal Human Lymphoid Tissues. *Am J Pathol.* 1999;154(1):193-201.
411. Kiener PA, Davis PM, Rankin BM, Klebanoff SJ, Ledbetter JA, Starling GC, Liles WC. Human monocytic cells contain high levels of intracellular Fas ligand: rapid release following cellular activation. *J Immunol.* 1997;159(4):1594-8.
412. Pinkoski MJ, Green DR. Fas ligand, death gene. *Cell Death Differ.* 1999;6(12):1174-81.
413. Kavurma MM, Khachigian LM. Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):36-44.
414. Ayroldi E, D'Adamio F, Zollo O, Agostini M, Moraca R, Cannarile L, Migliorati G, Delfino DV and Riccardi C (1999) Cloning and expression of a short Fas ligand: a new alternatively spliced product of the mouse Fas ligand gene. *Blood.* 1999;94(10):3456-67.
415. Kayagaki, N., A. Kawasaki, T. Ebata, H. Ohmoto, S. Ikeda, S. Inoue, K. Yoshino, K. Okumura, and H. Yagita. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J. Exp. Med.* 1995;182:1777-1783.
416. Garcia AJ, Tom C, Guemes M, Polanco G, Mayorga ME, Wend K, Miranda-Carboni GA, Krum SA. ER α signaling regulates MMP3 expression to induce FasL cleavage and osteoclast apoptosis. *J Bone Miner Res.* 2013;28(2):283-90.
417. Janssen O, Qian J, Linkermann A, Kabelitz D. CD95 ligand - death factor and costimulatory molecule? *Cell Death Differ.* 2003;10(11):1215-25.
418. Suzuki I, Fink PJ. Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. *J Exp Med.* 1998;187:123-128.
419. Lückerrath K1, Kirkin V, Melzer IM, Thalheimer FB, Siele D, Milani W, Adler T, Aguilar-Pimentel A, Horsch M, Michel G, Beckers J, Busch DH, Ollert M, Gailus-Durner V, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Staal FJ, Rajalingam K, Hueber AO, Strobl LJ, Zimmer-Strobl

- U, Zörnig M. Immune modulation by Fas ligand reverse signaling: lymphocyte proliferation is attenuated by the intracellular Fas ligand domain. *Blood*. 2011;117(2):519-29.
420. Kirkin V, Cahuzac N, Guardiola-Serrano F, Huault S, Lückerrath K, Friedmann E, Novac N, Wels WS, Martoglio B, Hueber AO, Zörnig M. The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death Differ*. 2007;14(9):1678-87.
421. Kirkin V1, Cahuzac N, Guardiola-Serrano F, Huault S, Lückerrath K, Friedmann E, Novac N, Wels WS, Martoglio B, Hueber AO, Zörnig M. The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death Differ*. 2007;14(9):1678-87.
422. Musiał K, Zwolińska D. Matrix metalloproteinases and soluble Fas/FasL system as novel regulators of apoptosis in children and young adults on chronic dialysis. *Apoptosis*. 2011;16(7):653-9.
423. Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*. 2009;325:332-336.
424. Alderson M, Tough TW, Davis-Smith T. MFas Ligand Mediates Activation-induced Cell Death in Human T Lymphocytes. *J Exp Med*. 1995;181(1):71-77.
425. Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet*. 1999;33:29-55.
426. Lang I, Fick A, Schäfer V, Giner T, Siegmund D, Wajant H. Signaling active CD95 receptor molecules trigger co-translocation of inactive CD95 molecules into lipid rafts. *J Biol Chem*. 2012;287(28):24026-42.
427. Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, Tinel A, Deperthes D, Calderara S, Schulthess T, Engel J, Schneider P, Tschopp J. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol*. 2003;23(4):1428-40.
428. Bossaller L1, Rathinam VA, Bonegio R, Chiang PI, Busto P, Wespiser AR, Caffrey DR, Li QZ, Mohan C, Fitzgerald KA, Latz E. Overexpression of membrane-bound fas ligand (CD95L) exacerbates autoimmune disease and renal pathology in pristane-induced lupus. *J Immunol*. 2013;191(5):2104-14.
429. Biglari B, Büchler A, Swing T, Biehl E, Roth HJ, Bruckner T, Schmidmaier G, Ferbert T, Gerner HJ, Moghaddam A. Increase in soluble CD95L during subacute phases after human spinal cord injury: a potential therapeutic target. *Spinal Cord*. 2013;51(3):183-7.

430. Kanda Y, Tanaka Y, Shirakawa K, Yatomi T, Nakamura N, Kami M, Saito T, Izutsu K, Asai T, Yuji K, Ogawa S, Honda H, Mitani K, Chiba S, Yazaki Y, Hirai H. Increased soluble Fas-ligand in sera of bone marrow transplant recipients with acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22:751-754.
431. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 2000; 288(5475):2354-7.
432. Varadhachary AS, Edidin M, Hanlon AM, Peter ME, Krammer PH, Salgame P. Phosphatidylinositol 3'-kinase blocks CD95 aggregation and caspase-8 cleavage at the death-inducing signaling complex by modulating lateral diffusion of CD95. *J Immunol.* 2001;166(11):6564-9.
433. Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, Ruberti G. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem.* 1999;274:38241-38250.
434. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. SPOTS: signaling protein oligomeric transduction structures are early mediators of death receptor-induced apoptosis at the plasma membrane. *J Cell Biol.* 2004;167:735-44.
435. Feig C, Tchikov V, Schütze S, Peter ME. Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *EMBO J.* 2007;26:221-31.
436. Chakrabandhu K, Hérincs Z, Huault S, Dost B, Peng L, Conchonaud F, Marguet D, He HT, Hueber AO. Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling. *EMBO J.* 2007;26(1):209-20.
437. O' Reilly LA, Tai L, Lee L, Kruse EA, Grabow S, Fairlie WD, Haynes NM, Tarlinton DM, Zhang JG, Belz GT, Smyth MJ, Bouillet P, Robb L, Strasser A. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature.* 2009;461(7264):659-63.
438. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity.* 2009;30(2):180-92.
439. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, Owen LB, Pope RM, Tschopp J, Wajant H, Wallach D, Wlirout RH, Zörnig M, Lynch DH. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell.* 2007;129(3):447-50.
440. Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schütze S, Peter ME, Chan AC. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J.* 2006;25(5):1009-23.

341. Dickens LS, Boyd RS, Jukes-Jones R, Hughes MA, Robinson GL, Fairall L, Schwabe JW, Cain K, Macfarlane M. A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Mol Cell*. 2012;47(2):291-305.
442. Scott FL, Stec B, Pop C, Dobaczewska MK, Lee JJ, Monosov E, Robinson H, Salvesen GS, Schwarzenbacher R, Riedl SJ. The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature*. 2009;457:1019-22.
443. Scaffidi C, Schmitz I, Krammer P H, Peter M E. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1999;274:1541-1548.
444. Fricker N, Beaudouin J, Richter P, Eils R, Krammer PH, Lavrik IN. Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIPL. *J Cell Biol*. 2010;190:377-89.
445. Takao Kataoka, Jürg Tschopp N-Terminal Fragment of c-FLIP(L) Processed by Caspase 8 Specifically Interacts with TRAF2 and Induces Activation of the NF- κ B Signaling Pathway *Mol Cell Biol*. 2004;24(7):2627-2636.
446. Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer P H, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase 8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem*. 2001;276:20633-2064.
447. Kober AM, Legewie S, Pforr C, Fricker N, Eils R, Krammer PH, Lavrik IN. Caspase-8 activity has an essential role in CD95/Fas-mediated MAPK activation. *Cell Death Dis*. 2011;2:e212.
448. Lavrik IN, Mock T, Golks A, Hoffmann JC, Baumann S, Krammer PH. CD95 stimulation results in the formation of a novel death effector domain protein-containing complex. *J Biol Chem*. 2008; 283: 26401-8.
449. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Death receptorsignaling. *J Cell Sci*. 2005;118:265-267.
450. Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A, Ceppi P. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ*. 2015;1-11.
451. Barnhart BC, Legembre P, Pietras E, Bubici C, Franzoso G, Peter ME. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *The EMBO Journal*. 2004;23(15):3175-3185.

452. Singh AP, Aggarwal A, Naik S, Misra R. Increased T-lymphocyte apoptosis in lupus correlates with disease activity and may be responsible for reduced T-cell frequency: a cross-sectional and longitudinal study. *Lupus*. 2009;18(9):785-91.
453. Kolackova M, Krejsek J, Svitek V, Kunes P, Mandak J, Holubcova, Lonsky V. The Effect of Conventional and Mini-Invasive Cardiopulmonary Bypass on Neutrophil Activation in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:152895.
454. Holmannova D, Kolackova M, Mandak J, Kunes P, Holubcova Z, Andrys C, Krejsek J. Effects of conventional CPB and mini-CPB on neutrophils CD162, CD166 and CD195 expression. *Exp Clin Cardiol*. 2014;20(9):4640-4650.
455. Gorbet MB and Sefton MV. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 2004;25(26):5681-703.
456. Valletly MP, Bannon PG, Bayeld MS, Hughes CF, Kritharides L. Endothelial activation after coronary artery bypass surgery: comparison between onpump and off-pump techniques. *Heart Lung Circ*. 2010;19(8):445-52.
457. Kim OY, Monsel A, Bertrand M, Coriat P, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Differential down-regulation of HLA-DR on monocyte subpopulations during systemic inflammation. *Crit Care*. 2010;14(2):R61.
458. Cheadle WG, Hershman MJ, Wellhausen SR, Polk HC Jr. HLA-DR antigen expression on peripheral blood monocytes correlates with surgical infection. *Am J Surg*. 1991;161(6):639-45.
459. Menger M, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch Surg*. 2004;389:475-484.
460. Ward NS, Casserly B and Ayala A. The Compensatory Anti-inflammatory Response syndrome (CARS) in Critically ill patients. *Clin Chest Med*. 2008;29(4):617-viii.
461. Gorczynski RM, Chen Z, Lee L, Yu K, Hu J. Anti-CD200R ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *Clin Immunol*. 2002;104:256-264.
462. Krejsek J, Kolackova M, Mandak J, Kunes P, Jankovicova K, Vlaskova D, Svitek V, Andrys C. Expression of CD200/CD200R regulatory molecules on granulocytes and monocytes is modulated by cardiac surgical operation. *Perfusion*. 2010;25(6):389-97.
463. Kunes P, Mandak J, Harrer J, Kolackova M, Andrys C, Holicka M, Krejsek J. Up-regulation of the Apo/Fas (CD95) complex on neutrophils harvested during cardiac surgery:

- distinct findings in patients operated on with or without the use of cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 2010;25(1):41-6.
464. Meadows JP, Tumlin JA, Clemens MG, McKillop IH, Evans S. Changes in neutrophil activity following cardiovascular surgery. *Open Access Surgery*. 2011;4;1-9.
465. Versteeg D, Dol E, Hoefer IE, Flier S, Buhre WF, de Kleijn D, van Dongen EP, Pasterkamp G, de Vries JP. Toll-like receptor 2 and 4 response and expression on monocytes decrease rapidly in patients undergoing arterial surgery and are related to preoperative smoking. *Shock*. 2009;31(1):21-7.
466. Fingerle-Rowson G, Auers J, Kreuzer E, Fraunberger P, Blumenstein M, Ziegler-Heitbrock LH. Expansion of CD14+CD16+ monocytes in critically ill cardiac surgery patients. *Inflammation*. 1998;22(4):367-79.
467. Sbrana S, Parri MS, De Filippis R, Gianetti J, Clerico A. Monitoring of monocyte functional state after extracorporeal circulation: a flow cytometry study. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;58(1):17-24.
468. Gessler P, Pretre R, Bürki C, Rousson V, Frey B, Nadal D. Monocyte function-associated antigen expression during and after pediatric cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130(1):54-60.
469. Kolackova M, Kudlova M, Kunes P, Lonsky V, Mandak J, Andrys C, Jankovicova K, Krejsek J. Early expression of FcγRI (CD64) on monocytes of cardiac surgical patients and higher density of monocyte anti-inflammatory scavenger CD163 receptor in "on-pump" patients. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:235461.
470. Djebara S, Cauchie P, Alewaeters A, Daper A, Fosse E, Zouaoui Boujelta K, Biston P. CD64, a marker of leucocyte activation kinetics after uncomplicated cardiac surgery. *Critical Care*. 2010;14(Suppl 1):P16.
471. Mayers I, Hurst T, Puttagunta L, Radomski A, Mycyk T, Sawicki G, Johnson D, Radomski MW. Cardiac surgery increases the activity of matrix metalloproteinases and nitric oxide synthase in human hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;122(4):746-52.
472. Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood* 2009 12;113(11):2394-401.
473. Liles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med*. 1996;184(2):429-40.

474. Chello M, Mastroroberto P, Quirino A, Cuda G, Perticone F, Cirillo F, Covino E. Inhibition of neutrophil apoptosis after coronary bypass operation with cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2002;73(1):123-9.
475. Fanning NF, Porter J, Shorten GD, Kirwan WO, Bouchier-Hayes D, Cotter TG, Redmond HP. Inhibition of neutrophil apoptosis after elective surgery. *Surgery*. 1999;126(3):527-34.
476. Kobayashi E, Yamauchi H. Interleukin-6 and a delay of neutrophil apoptosis after major surgery. *Arch Surg*. 1997;132(2):209-210.
477. Matsuda T, Saito H, Fukatsu K, Han I, Inoue T, Furukawa S, Ikeda S, Hidemura A. Cytokine-modulated inhibition of neutrophil apoptosis at local site augments exudative neutrophil functions and reflects inflammatory response after surgery. *Surgery*. 2001;129(1):76-85.
478. Suzuki R, Iwase M, Miyaoka K, Kondo G, Watanabe H, Ohashi M, Nagumo M. Modulation of neutrophil apoptosis in plasma of patients after orthognathic surgery. *J Surg Res*. 2006;130(1):110-8.
479. Delogu G, Moretti S, Famularo G, Antonucci A, Signore L, Marcellini S, Lo Bosco L, De Simone C. Circulating neutrophils exhibit enhanced apoptosis associated with mitochondrial dysfunctions after surgery under general anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2001;45(1):87-94.
480. Iwase M, Kondo G, Watanabe H, Takaoka S, Uchida M, Ohashi M, Nagumo M. Regulation of Fas-mediated apoptosis in neutrophils after surgery-induced acute inflammation. *J Surg Res*. 2006;134(1):114-23.
481. Perlman H, Pagliari LJ, Nguyen Net, Bradley K, Liu H, Pope RM. The Fas-FasL death receptor and PI3K pathways independently regulate monocyte homeostasis. *Eur J Immunol*. 2001;31(8):2421-30.
482. Kawahito K, Misawa Y, Fuse K. Transient rise in serum soluble Fas (APO-1/CD95) in patients undergoing cardiac surgery. *Artif Organs*. 2000;24(8):628-31.
483. Papathanassoglou ED, Moynihan JA, McDermott MP, Ackerman MH. Expression of Fas (CD95) and Fas ligand on peripheral blood mononuclear cells in critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival. *Crit Care Med*. 2001;29(4):709-18.

484. Torre D, Tambini R, Manfredi M, Mangani V, Livi P, Maldifassi V, Campi P, Speranza F. Circulating levels of FAS/APO-1 in patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;45(4):233-6.
485. Lin TC, Li CY, Tsai CS, Ku CH, Wu CT, Wong CS, Ho ST. Neutrophil-mediated secretion and activation of matrix metalloproteinase-9 during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg*. 2005;100(6):1554-60.
486. Marsik C, Halama T, Cardona F, Wlassits W, Mayr F, Pleiner J, Jilma B. Regulation of Fas (APO-1, CD95) and Fas ligand expression in leukocytes during systemic inflammation in humans. *Shock*. 2003;20(6):493-6.
487. Paunel-Görgülü A, Lögters T, Flohé S, Cinatl J, Altrichter J, Windolf J, Scholz M. Stimulation of Fas signaling down-regulates activity of neutrophils from major trauma patients with SIRS. *Immunobiolog*. 2011;216(3):334-42.
488. Paunel-Görgülü A, Zörnig M, Lögters T, Altrichter J, Rabenhorst U, Cinatl J, Windolf J, Scholz M. Mcl-1-mediated impairment of the intrinsic apoptosis pathway in circulating neutrophils from critically ill patients can be overcome by Fas stimulation. *J Immunol*. 2009;183(10):6198-206.
489. Park DR, Thomsen AR, Frevert CW, Pham U, Skerrett SJ, Kiener PA, Liles WC. Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 2003;170(12):6209-16.
490. Peter ME, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):26-35.
491. Scholz M, Simon A, Berg M, Schuller AM, Hacibayramoglu M, Margraf S, Theisen A, Windolf J, Wimmer-Greinecker G, Moritz A. In vivo inhibition of neutrophil activity by a FAS (CD95) stimulating module: arterial in-line application in a porcine cardiac surgery model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;127(6):1735-42.
492. Strasser A, Jost PJ, Nagata S: The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*. 2009;30:180-192.
493. Windolf J, Simon A, Moritz A, Bitu-Moreno J. First efficacy and safety results with the antibody containing leukocyte inhibition module in cardiac surgery patients with neutrophil hyperactivity. *ASAIO J*. 2005;51(2):144-7.
494. Vaki I, Kranidioti H, Karagianni V, Spyridaki A, Kotsaki A, Routsis C, Giamarellos-Bourboulis EJ. An early circulating factor in severe sepsis modulates apoptosis of monocytes and lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 2011;89(3):343-9.

495. Conte E, Manzella L, Zeuner A, Cocchiario G, Conticello C, Zammataro L, Messina CG, De Maria R, Messina A. Involvement of interferon regulatory factor-1 in monocyte CD95 expression and CD95-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 2003;10(5):615-7.
496. Schmidt M, Lügering N, Lügering A, Pauels HG, Schulze-Osthoff K, Domschke W, Kucharzik T. Role of the CD95/CD95 ligand system in glucocorticoid-induced monocyte apoptosis. *J Immunol.* 2001;166(2):1344-51.
497. Park DR, Thomsen AR, Frevert CW, Pham U, Skerrett SJ, Kiener PA, Liles WC. Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol.* 2003;170(12):6209-16.
498. Daigle I, Rückert B, Schnetzler G, Simon HU. Simon. Induction of the IL-10 gene via the fas receptor in monocytes - an anti-inflammatory mechanism in the absence of apoptosis. *Eur J Immunol.* 2000;30(10):2991-7.
499. Cardinaux JR, Allaman I, Magistretti PJ: Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBPbeta and C/EBPdelta in astrocytes. *Glia.* 2000;29:91-97.
500. Dentesano G, Straccia M, Ejarque-Ortiz A, Tusell JM, Serratosa J, Saura J, Solà C. Inhibition of CD200R1 expression by C/EBP β in reactive microglial cells. *J Neuroinflammation.* 2012;9:165.
501. Gutsch R, Kandemir JD, Pietsch D, Cappello C, Meyer J, Simanowski K, Huber R, Brand K. CCAAT/enhancer-binding protein beta inhibits proliferation in monocytic cells by affecting the retinoblastoma protein/E2F/cyclin E pathway but is not directly required for macrophage morphology. *J Biol Chem.* 2011;286(26):22716-29.
502. Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington CJ, Mizuno S, Imanishi J, Akashi K, Tenen DG. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol.* 2006;7(7):732-9.
503. Huber R, Pietsch D, Panterodt T, Brand K. Regulation of C/EBP β and resulting functions in cells of the monocytic lineage. *Cell Signal.* 2012;24(6):1287-96.
504. Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 2007;6(2):137-43.
505. Reddy RC, Narala VR, Keshamouni VG, Milam JE, Newstead MW, Standiford TJ. Sepsis-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is mediated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Blood.* 2008;112(10):4250-8.

506. von Knethen A, Brüne B. PPARgamma--an important regulator of monocyte/macrophage function. *Arch Immunol Ther Exp. (Warsz)*. 2003;51(4):219-26.
507. Dentesano G, Serratosa J, Tusell JM, Ramón P, Valente T, Saura J, Solà C. CD200R1 and CD200 expression are regulated by PPAR- γ in activated glial cells. *Glia*. 2014;62(6):982-98.
508. Kos O, Hughson RL, Hart DA, Clément G, Frings-Meuthen P, Linnarsson D, Paloski WH, Rittweger J, Wuyts F, Zange J, Gorczynski RM. Elevated serum soluble CD200 and CD200R as surrogate markers of bone loss under bed rest conditions. *Bone*. 2014;60:33-40.
509. Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schütze S, Peter ME, Chan AC. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J*. 2006;25(5):1009-23.
510. Mahrshahi R, Neil Barclay AN, Brown MH. Essential Roles for Dok2 and RasGAP in CD200 Receptor-Mediated Regulation of Human Myeloid Cells. *J Immunol*. 2009;183(8):4879-4886.
511. Holmannova D, Kolackova M, Kunes P, Krejsek J, Mandak J, Andrys C. Impact of cardiac surgery on the expression of CD40, CD80, CD86 and HLA-DR on B cells and monocytes. *Perfusion*. 2016;31(5):391-400.

10.1 PUBLIKOVANÉ ČLÁNKY

Holmannova D, Kolackova M, Kunes P, Krejsek J, Mandak J, Andrys C. Impact of cardiac surgery on the expression of CD40, CD80, CD86 and HLA-DR on B cells and monocytes. *Perfusion*. 2016;31(5):391-400.

Holmannova D, Kolackova M, Mandak J, Kunes P, Holubcova Z, Krejsek J, Vlaskova D, Andrys C. Inhibitory CD200R and proapoptotic CD95/CD95L molecules on innate immunity cells are modulated by cardiac surgery. *Perfusion*. 2015;30(7):543-55.

Holmannova D, Kolackova M, Mandak J, Kunes P, Holubcova Z, Andrys C, Krejsek J. Effects of conventional CPB and mini-CPB on neutrophils CD162, CD166 and CD195 expression. *Exp Clin Cardiol* 2014;20(9):4640.

Holubcova Z, Kunes P, Mandak J, Vlaskova D, Kolackova M, Holmannova D, Andrys C, Krejsek J, Holubec T. Pentraxin 3 and other inflammatory biomarkers related to atrial fibrillation in cardiac surgery. *Perfusion*. 2016. pii: 0267659116679248.

Holmannová D, Kolářková M, Kondělková K, Kunes P, Krejsek J, Andrýs C. CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part I: CD200/CD200R structure, activation, and function. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2012;55(1):12-7.

Holmannová D, Kolářková M, Kondělková K, Kunes P, Krejsek J, Ctírad A. CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part II: CD200/CD200R potential clinical applications. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2012;55(2):59-65.

Holmannová D, Kolářková M, Krejsek J. Fyziologická úloha vitaminu C ve vztahu ke složkám imunitního systému. *Vnitr Lek* 2012;58(10): 743-749.

Krejsek J, Kolářková M, Mand'ák J, Kunes P, Holubcová Z, Holmannová D, AbuAttieh M, Andrýs C. TLR2 and TLR4 expression on blood monocytes and granulocytes of cardiac surgical patients is not affected by the use of cardiopulmonary bypass. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2013;56(2):57-66.

Holmannová D, Kolářková M, Krejsek J. Resolviny, maresiny a 14, 21-dihydroxy DHA – lipidové mediátory s protizánětlivými a reparačními účinky vzniklé přeměnou ω -3 nenasycených mastných kyselin. *Alergie* 2012;14(4):262-265.

Holmannova D. Imunomodulační proteiny z medicínálních hub. *Prakt. Léč.* 2016; 96(6):251-254.